UNTERSUCHUNGEN ZUR HALTUNG VON TRYPANOSOMA EVANSI IN VERSCHIEDENEN SUBSTRATEN

WOLFGANG HÖGNER

München 1979

Aus dem Institut für Vergleichende Tropenmedizin
und Parasitologie des Fachbereichs Tiermedizin
der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Dr. h. c. J. Boch

Arbeit angefertigt unter Leitung von Prof. Dr. H. K. Dennig

UNTERSUCHUNGEN ZUR HALTUNG VON TRYPANOSOMA EVANSI IN VERSCHIEDENEN SUBSTRATEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
des Fachbereichs Tiermedizin
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
WOLFGANG HÖGNER
aus
Ingolstadt

München 1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Tiermedizin
der Universität München

Dekan : Prof. Dr. H. Kräußlich
Referent : Prof. Dr. H. K. Dennig
Korreferent : Prof. Dr. H. Mahnel

Tag der Promotion: 23. Februar 1979

Meiner lieben Mutter

INHALTSÜBERSICHT

		Seite
I.	Einleitung	3
II.	Haltung und Kultivierung von Trypanosoma evansi und von T. evansi-verwandten Arten (anhand der Literatur)	5
III.	Eigene Untersuchungen	15
	A. Material und Methoden	15
	B. Ergebnisse	23
	1. Einfluß der physikalischen, chemischen und technischen Methodik auf Lebensdauer und Infektiosität von T. evansi	23
	2. Einfluß unterschiedlicher Mediumzusätze auf Überlebenszeit und Infektiosität von T. evansi	32
	3. Lebensdauer und Infektiosität von T. evansi in verschiedenen physiologischen Elektrolytlösungen und Kulturmedien	41
	4. Einfluß unterschiedlicher Haltungsfaktoren auf Überlebenszeit und Infektiosität von T. evansi	55
IV.	Besprechung der Ergebnisse	61
V.	Zusammenfassung	72
	Summary	73
VI.	Literaturverzeichnis	74
	Lebenslauf	

I. EINLEITUNG

Trypanosoma evansi, der Erreger der "Surra", ist im Norden Afrikas, in Asien und in Teilen Süd- und Mittelamerikas beheimatet. Der Parasit kommt in erster Linie bei Haus-, gelegentlich auch bei Wildtieren vor. Von wirtschaftlicher Bedeutung ist die "Surra" primär bei Equiden und Cameliden.

Im Gegensatz zu T. brucei, dem Erreger der "Nagana", und den meisten anderen Trypanosomenarten, hat T. evansi die Fähigkeit der zyklischen Entwicklung im Vektor verloren. Der Parasit wird mechanisch, hauptsächlich durch Tabaniden, übertragen. Dennoch wird zwischen T. evansi und T. brucei eine phylogenetische Verwandtschaft vermutet. Diese Annahme wird vor allem durch die morphologischen Übereinstimmungen der Blutformen beider Spezies gestützt, darüber hinaus durch die Hypothese, daß sich T. evansi nach Verschleppung von T. brucei in glossinenfreie Gebiete als neue Art entwickelt habe. Die unterschiedliche Entwicklungs- und Übertragungsform beider Parasitenspezies wird auf die Verschiedenheit der Vektoren - Glossinen und Tabaniden - in den jeweiligen Biotopen zurückgeführt.

Die Züchtung von Trypanosomen mit zyklischer und azyklischer Entwicklung ist auf der Mehrzahl von Haus-, Labor- und Wildtieren ohne Schwierigkeiten möglich. Auf Nährsubstraten und Gewebekulturen gestaltet sich die Haltung und Kultivierung von Trypanosomen mit zyklischer Entwicklung wesentlich schwieriger. Bislang entwickelten sich vorwiegend die Vektorenformen. Erst in jüngster Zeit konnten trypomastigote Blutformen in Gewebekulturen gezüchtet werden. Die Kultivierung von Trypanosomen mit azyklischer Entwicklung ist bis heute nur in Einzelfällen gelungen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Erhaltungsmedien zu erproben und zu entwickeln, die T. evansi eine möglichst lange Überlebenszeit gewähren. Dabei sollte es sich um Medien handeln, die als Fertigmedien im Handel oder ohne großen Aufwand herstellbar sind, damit sie auch in der Feldarbeit Verwendung finden können.

II. HALTUNG UND KULTIVIERUNG VON TRYPANOSOMA EVANSI UND VON TRYPANOSOMA EVANSI-VERWANDTEN ARTEN (anhand der Literatur)

Im Hinblick auf die verwandtschaftlichen Beziehungen von T. evansi mit den Trypanosomen der Brucei-Gruppe (HOARE, 1972), sind in der folgenden Literaturübersicht die Arbeiten über Haltung und Kultivierung von Trypanosomen dieses Komplexes zusammengefaßt.

Trypanosoma brucei-Gruppe

Die Haltung und Kultivierung von T. brucei und den T. brucei-ähnlichen Spezies ist - abgesehen von T. evansi - in einer Vielzahl unterschiedlicher Medien möglich. Entsprechend ihrer physikalischen und biologischen Eigenschaften lassen sie sich in bi- und monophasige Medien und in Gewebekulturen unterteilen.

Biphasige Medien

Zweiphasige Medien bestehen aus einer festen und einer flüssigen Komponente. Es handelt sich dabei meist um modifizierten Agar mit dem Überstand einer physiologischen Elektrolytlösung. Diese Medien wurden in den Arbeiten vieler Autoren sowohl hinsichtlich ihrer Zusammensetzung als auch der Konzentration der einzelnen Komponenten variiert. Als Bestandteile der Medien wurden für die feste Phase hauptsächlich Fleischbrühe, Pepton, Kochsalz, Agar und Blut, für die flüssige Phase physiologische Elektrolyt-Glukose-Lösungen oder Fleisch-Pepton-Brühe mit Glukose beschrieben (TOBIE, 1964).

NOVY und MAC NEAL (1904) kultivierten erstmals T. brucei erfolgreich auf einem zweiphasigen Medium, bestehend aus Nähragar und defibrinisiertem Kaninchenblut. Die Trypanosomen entwickelten sich auf der Oberfläche des Agars bzw. im Kondenswasser, das sich

auf dem festen Agar bildete. Den Autoren war es möglich, T. brucei in 8 Passagen 100 Tage lang bei Zimmertemperatur zu kultivieren, bevor sie den Versuch abbrachen. Dabei machten sie die Feststellung, daß sich von den Kulturen, die aus einer Vielzahl positiver Versuchstiere angelegt wurden, nur wenige anzüchten ließen. Eine Infektiosität des Parasiten für Mäuse konnte nur bis zur 3. Passage nachgewiesen werden.

NICOLLE (1908) vereinfachte und modifizierte die Herstellung des NOVY-MAC NEAL-Mediums (NN-Medium) insbesondere durch den Zusatz von Kochsalzlösung. In diesem NOVY-MAC NEAL-NICOLLE-Medium (NNN-Medium) war Leishmania donovani bei 37°C über 5 Tage bzw. bei 19° bis 23°C über 9 Tage züchtbar.

TOBIE, VON BRAND und MEHLMAN (1950) kultivierten T. gambiense und T. rhodesiense in einem weiter entwickelten Medium über 2 Jahre hinweg. Es bestand aus Bactobeef, Bactopepton, Kochsalz, Agar, inaktiviertem Kaninchenblut und der Lösung nach Locke. Im Temperaturbereich zwischen 20° und 30°C, in dem dieser und auch die Mehrzahl der Versuche anderer Autoren stattfanden, entwickelten sich ausschließlich die Vektorenformen der Parasiten, in erster Linie die nicht infektiösen Darmformen. Durch Inaktivierung des Blutanteils bei 56°C über 30 Minuten konnte der Züchtungserfolg weiter verbessert werden.

WEINMAN (1953, 1960) führte die Kultivierung von T. gambiense und T. rhodesiense in einem Medium durch, das sich aus Nähragar sowie Plasma und Erythrozyten menschlichen Ursprungs zusammensetzte. Er wies nach, daß statt der bis dahin üblichen Inaktivierung des gesamten Blutes auch eine Inaktivierung des Serum- bzw. Plasmaanteils ausreicht. Später ersetzte er die Inaktivierung des Blutanteils durch die Zugabe von P.V.S.A. (Polyvinylschwefelsäure) zum Blut, einer Substanz, die antikoagulierende und antikomplementbildende Eigenschaften aufweist.

LEHMANN (1960, 1961, 1963a, b) baute auf dem zweiphasigen NNN-Medium und dem Medium nach TOBIE (1950) mehrere Modifikationen auf, in denen er mit Erfolg T. brucei und T. rhodesiense züchten und differenzieren konnte.

AMREIN, GEIGY und KAUFMANN (1965) untersuchten das Infektionsverhalten von Trypanosomen der Brucei-Gruppe im WEINMAN-Medium. Sie stellten fest, daß bei der Kultivierung der Parasiten die Infektiosität in den ersten 8 Tagen verloren ging. Nach einem allmählichen Anstieg erreichte sie um den 18. Tag einen Höhepunkt. Kulturen, die älter als 23 Tage waren, zeigten einen starken Abfall der Infektiosität. Die Autoren brachten das Infektionsverhalten der kultivierten Trypanosomen in Zusammenhang mit dem Entwicklungszyklus des Parasiten im Vektor, der hinsichtlich der Infektiosität einen zeitlich ähnlichen Ablauf aufweist. Darüber hinaus machten die Verfasser klar, daß das Infektionsverhalten der Trypanosomen in der Kultur auch vom Spender des jeweils verwendeten Blutes und vom Alter des Mediums vor dem Gebrauch beeinflußt wird.

MENDEZ und HONIGBERG (1972) beschäftigten sich hauptsächlich mit dem Infektionsverhalten von Trypanosomen der T. brucei-Gruppe in der Kultur. Sie modifizierten dazu das Medium nach TOBIE durch Ergänzung der flüssigen Phase mit foetalem Kälberserum und Hühnerembryonalextrakt. Dabei stellten sie fest, daß die Infektiosität der kultivierten Trypanosomen ausschließlich an die Anwesenheit bzw. an den prozentualen Anteil trypomastigoter Formen gebunden ist. Zur Verlängerung der Lebensdauer der Blutformen, die allmählich durch avirulente Vektorenformen ersetzt wurden, gaben sie Mäuse-L-Zellen hinzu und verlängerten damit die Infektiosität eines T. rhodesiense-Stammes von 3 auf 5 Tage.

Monophasige Medien

Monophasige Medien bestehen aus einer einzigen, meist flüssigen Phase. Diese setzt sich im allgemeinen aus physiologischen Elektrolytlösungen, Gewebekulturmedien, Glukose sowie Blutbestandteilen zusammen, die entsprechend der jeweiligen Fragestellung kombiniert bzw. modifiziert werden.

PONSELLE (1924) kultivierte T. brucei und T. rhodesiense in einem viskösen Medium, bestehend aus Kochsalzlösung verschiedener Konzentration, Gelatine, Pepton, Sodalösung und Kaninchenblut oder -serum. Je nach der zu kultivierenden Trypanosomenart, variierte er die Kochsalzkonzentration. Die Trypanosomen vermehrten sich bei 23° bis 26°C über 15 Tage hinweg. Subkulturen wurden im Abstand von 7 bis 8 Tagen angelegt. In der Kultur ging die Infektiosität der Trypanosomen verloren.

RAZGHA (1929) züchtete T. gambiense im Medium nach PONSELLE 44 Tage lang bei 22° bis 24°C. Er beobachtete nach anfänglicher Abnahme der Parasitenzahl eine langsame Zunahme der Kulturformen. Bis zum 6. Tag nach der Inokulation des Mediums blieb die Infektiosität des Parasiten für Mäuse erhalten.

REICHENOW (1934) und BRUTSAERT und HENRARD (1936, 1938) verwendeten flüssige Medien, bestehend aus Citratblut und Ringer- oder Tyrodelösung. REICHENOW kultivierte darin T. gambiense bei einer Temperatur von 24°C in 18 Generationen über 264 Tage hinweg. BRUTSAERT und HENRARD (1936) konnten den Züchtungserfolg noch verbessern. Die Kultivierung von T. gambiense gelang ihnen in 49 Subkulturen über 428 Tage. T. brucei konnte bei 24 Subkulturen 206 Tage lang kultiviert werden. Eine weitere Verbesserung erreichen die beiden Autoren (1938) durch den Zusatz von "Liquoide"

(Fa. Roche), das wie P.V.S.A. antikoagulierende und antikomplementbildende Eigenschaften aufweist. Die Überlebenszeit der Parasiten stieg damit auf über 500 Tage an.

NICOLI (1961) und JADIN und LE RAY (1969) führten die Züchtung von T. gambiense bzw. T. gambiense und T. brucei in wesentlich komplizierteren Medien durch, die aus physiologischer Elektrolytlösung, Kälberserum, Laktalbuminhydrolysat, verdünntem und inaktiviertem Erythrozytenlysat und Glukose bestanden. Die besten Erfolge verzeichnete NICOLI, wenn Subkulturen am 4. bis 5. Tag, am Ende der exponentiellen Wachstumsphase, oder am 6. bis 12. Tag, während der stationären Phase, angelegt wurden. Laktalbuminhydrolysat konnte der Verfasser durch Zusatz von 13 Aminosäuren ersetzen.

DODIN und FROMENTIN (1962) verwendeten Medien aus vorwiegend definierten Komponenten. Sie kombinierten das Kulturmedium M 199 mit dem flüssigen Überstand des Mediums nach TOBIE (1950) unter Hinzufügung von verdünntem Erythrozytenlysat. Sie züchteten T. gambiense über 9 Passagen. Die wesentliche Erkenntnis ihrer Versuche bestand darin, daß schon der Kontakt des Mediums M 199 mit Erythrozyten über 24 Stunden bei 37°C zur erfolgreichen Kultivierung von T. gambiense, auch bei Abwesenheit von Serum, ausreichte. Weitere Untersuchungen führten FROMENTIN (1972) zu der Vermutung, daß das Wachstum von T. gambiense an die Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Aktivität der Erythrozyten gebunden sei, und zwar unabhängig von der Hämoglobin-Konzentration.

AWAD et al. (1969) untersuchten die Haltung von T. brucei in verschiedenen Elektrolytlösungen, in Kaninchenserum und in Rattenblut. Die Lebensdauer der Trypanosomen reichte in Elektrolytlösungen maximal bis zu 12 Stunden, im Serum bis über 24 Stunden.

Die Infektiosität der Parasiten gegenüber Mäusen war in Elektrolytlösungen spätestens nach 6, im Serum nach 24 Stunden erloschen.

PITTAM (1970) verwendete ein Medium, in dem T. brucei und T. rhodesiense für Stoffwechselversuche in großen Mengen züchtbar waren. Das Medium bestand aus Tryptose, Caseinhydrolysat, Leberkonzentrat, Glukose und Blutlysat von Menschen. Nach Angabe des Autors vermehrten sich darin die Parasiten bei entsprechenden Subkulturen und bei Temperaturen von 26° bis 28°C "unbegrenzt".

RAETHER und SEIDENATH (1973) verglichen eine Reihe physiologischer Lösungen hinsichtlich ihres schonendsten Einflusses auf die Haltung von T. rhodesiense. Den besten Erfolg erzielten die Autoren in Phosphatpuffer-Glukose-Lösung (PSG-3) mit einer Überlebenszeit von 24 Stunden. Die Infektiosität für Mäuse blieb 2 1/2 Stunden erhalten. In Haemaccel^{R}, einem synthetischen Plasmaexpander, betrug die Überlebenszeit 7 Stunden bei einem Infektiositätsabfall nach 3 Stunden. Die Verfasser stellten weiterhin fest, daß auch bei trypomastigoten Formen mit hoher Motilität die Infektiosität fehlen kann.

CROSS und MANNING (1973) und BRUN und JENNI (1977) entwickelten zur Kultivierung von T. brucei verschiedene komplexe Medien. Sie ergänzten die Kulturmedien M 199, MEM oder Kombinationen der beiden mit Aminosäuren, Vitaminen, Elektrolyten und einigen anderen definierten Komponenten. Den Blutanteil ersetzten sie durch Haeminlösung. CROSS und MANNING erzielten den besten Erfolg in einem pH-Bereich von 7, 2 bis 7, 4, während dieser bei BRUN und JENNI zwischen 6, 7 und 7, 3 lag. Beide Autorengruppen kultivierten die Vektorenformen der Parasiten bei regelmäßigen Passagen über lange Zeiträume hinweg.

Gewebekulturen

Zahlreiche Protozoenarten lassen sich auf Nährmedien, in denen sich lebende Körperzellen befinden, besonders günstig halten und vermehren. Auch für die Kultivierung von Trypanosomen wurde die Gewebekultur mit Erfolg verwendet.

TRAGER (1959) züchtete T. brucei in Anwesenheit von Glossina palpalis-Gewebe, d. h. von lebenden Zellen des Überträgers, in regelmäßigen Passagen über 56 Tage hinweg. Als Nährsubstrat verwendete er undefinierte Medien, deren Hauptbestandteile Hefeextrakt, Laktalbuminhydrolysat und Schafserum waren. Die Bebrütungstemperatur lag bei 28°C. Eine ca. 20stündige Temperaturerhöhung auf 38°C führte zu Formtypen, die nicht von infektiösen, metazyklischen Trypanosomen unterscheidbar waren. Dennoch fehlte diesen Formen die Infektiosität.

Gewebekulturen mit Vertebratenzellen (HeLa-, HEP-Zellen) verwendeten DEMARCHI und NICOLI (1960) zur Züchtung von T. gambiense und T. rhodesiense. Als Substrat diente Lepine's Medium mit Caseinhydrolysat und Kälberserum. Die Passagierung der Parasiten wurde nach der stärksten Parasitenvermehrung, zwischen dem 6. und 7. Tag, am Ende der exponentiellen Wachstumskurve, vorgenommen. Die Trypanosomen verloren bei Temperaturen von 23° bis 31°C schon nach der ersten Passage ihre Infektiosität für Versuchstiere.

FROMENTIN (1961) untersuchte die Abhängigkeit zwischen Parasitenvermehrung und Haltungstemperatur. Als Kulturmedien verwendete er Hühner-Fibroblasten und KB-Zellen in monophasigen Nährsubstraten. Die Züchtung von T. gambiense war bei 28°C ohne Schwierigkeiten bis zu 3 Wochen möglich. Subkulturen überlebten bei 20°C

bis zu 7 Wochen, bei 6°C bis zu 2 Wochen. Bei 37°C gelang eine Kultivierung der Parasiten nicht. Trypanosomen aus diesen Kulturen waren nicht infektionsfähig.

LE PAGE (1967) züchtete bei einer Temperatur von 37°C T. brucei in Gewebekulturen mit Mäuse-L-Zellen und dem Kulturmedium NCTC 109 mit 10 % Kälberserum als Substrat. Eine Vermehrung der Parasiten fand nur innerhalb der ersten 20 bis 30 Stunden statt. Ihre Infektiosität blieb bis maximal 70 Stunden erhalten.

HAWKING (1971) kam bei seinen Kultivierungsversuchen mit T. brucei zu einem ähnlichen Ergebnis. Die Parasiten vermehrten sich bei 37°C ebenfalls nur innerhalb der ersten 24 Stunden. Hühnerembryo- und BHK-Zellen erwiesen sich für eine Züchtung günstiger als KB- und HEK-(human embryo kidney) Zellen. Eagle's Medium mit 20 % Kälberserum, das ihm als Substrat diente, war durch das Kulturmedium M 199 ersetzbar. Durch Medienwechsel steigerte er die Überlebenszeit von 6 auf 10 Tage. Der Zusatz von Erythrozyten, auch in geringer Menge, hatte eine deutliche Verlängerung der Lebensdauer zur Folge.

HIRUMI, DOYLE und HIRUMI (1977) züchteten die trypomastigoten Formen von T. brucei im Kulturmedium RPMI 1640 mit 20 % foetalem Kälberserum bei Anwesenheit von Rinder-Fibroblasten unter Zusatz von HEPES-Puffer. Die Parasiten lebten bei wöchentlicher Passagierung über 310 Tage. Während der gesamten Versuchsdauer behielten die Trypanosomen ihre Infektiosität für Mäuse.

Trypanosoma evansi

NOVY, MAC NEAL und HARE (1904) berichteten von der ersten erfolgreichen Züchtung von T. evansi im NOVY-MAC NEAL-Medium (NN-Medium). Dieser Kultivierungserfolg erscheint fragwürdig, da es sich nach Ansicht von HOARE (1972) bei den beschriebenen Trypanosomen nicht um T. evansi, sondern um das leicht anzüchtbare T. theileri gehandelt haben muß.

KLIGLER und WEITZMAN (1925) beobachteten bei T. evansi in einem Gemisch aus physiologischer Kochsalzlösung und Meerschweinchenserum bei 25°C eine Überlebenszeit von 24 Stunden. Die Motilität der Parasiten nahm während des Versuchs laufend ab.

REICHENOW (1935) versuchte die Züchtung von Trypanosomen mit azyklischer Entwicklung (T. equinum, T. equiperdum) in einem monophasigen flüssigen Medium aus Citratblut und Ringerlösung. Er beobachtete jedoch keine Vermehrung, sondern eine stetige Abnahme der Parasitenzahl bis zum 6. Tage.

Versuche von MÜHLPFORDT (1963), akinetoplastische Stämme von T. evansi auf dem Medium nach Bonacci zu züchten, schlugen fehl.

BALIS (1963) befaßte sich im Rahmen von Stoffwechselversuchen intensiv mit der Haltung und Kultivierung von T. evansi. Er arbeitete mit mono- und biphasigen Medien, beide auf der Grundlage von defibrinisiertem Pferdeblut. In Medien ohne Blutzusatz lebten die Parasiten nur 2 bis 3 Stunden. In reinem Pferdeblut betrug die Überlebenszeit maximal 12 Stunden. Der Zusatz von Glukose, Vitamin C und in geringerem Maße von Glycerin verlängerte die Lebensdauer weiterhin. Günstiger als Vollblut erwies sich hämolysiertes Blut, von dem bereits geringe Mengen ausreichten. Die Zu-

gabe von Phosphatpuffer, inaktiviertem Pferdeserum und Agar steigerte die Überlebenszeit auf 48 Stunden. Der optimale pH-Bereich lag bei 7, 5. Weiterhin untersuchte BALIS den Einfluß von Sauerstoff auf die Trypanosomenkultur. Dauernde Sauerstoffzufuhr oder kontinuierliches Schütteln zeigten keine wesentliche Verbesserung. In weiteren Arbeiten (1964 a, b, 1965) untersuchte der Verfasser den Kohlenhydrat- und Proteinmetabolismus von T. evansi. In keinem der verwendeten Medien beobachtete er eine Vermehrung der Parasiten. Prüfungen der Infektiosität wurden nicht durchgeführt.

LE PAGE (1967) beschrieb eine Trypanosomenvermehrung in der Gewebekultur mit Mäuse-L-Zellen im Kulturmedium NCTC 109 mit 10 % Kälberserum bei einer Temperatur von 37°C. Es handelte sich um einen akinetoplastischen T. evansi-Stamm. Eine Zunahme der Parasitenzahl fand allerdings nur innerhalb der ersten 24 Stunden statt. Danach verringerte sie sich ständig.

GOEL und SINGH (1969) beobachteten eine Überlebenszeit von 21 Tagen, wenn T. evansi in einem Gemisch aus Alsever's Lösung und Hundeblut bei Kühlschranktemperatur gehalten wurde. Ein Verlust der Infektiosität trat in dieser Zeit nicht auf.

MATHUR (1971) kultivierte eine polymorphe Variante von T. evansi, die nach Behandlung der Parasiten mit Berenil auftrat, auf dem NNNN-Agar nach BAKER (1966). Die Überlebenszeit betrug 26 Tage bei einer Passagierung in 3 bis 4tägigem Abstand. In der Kultur entwickelten sich ausschließlich trypomastigote Formen, die für Mäuse nicht infektiös waren.

III. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

A. MATERIAL UND METHODEN

Trypanosoma evansi-Stamm

Der verwendete Trypanosoma evansi-Stamm (Bali) wurde 1975 von Dennig auf Bali/Indonesien aus dem Blut eines Rindes isoliert. Der Stamm wird am Institut für Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie auf verschiedenen Tierarten - Mäusen, Ratten, Hamstern, Meerschweinchen, Kaninchen, Katzen, Hunden, Schweinen, Ziegen und Pferden - passagiert. Es handelt sich dabei um einen Stamm von hoher Pathogenität für Mäuse, Ratten, Katzen und Pferde.

Versuchstiere und ihre Haltung

Zur Passage und Prüfung der Infektiosität wurden männliche Mäuse (NMRI-Stamm, Hann.) aus institutseigener Zucht verwendet. Das Alter der Tiere betrug bei Versuchsbeginn 6 bis 8 Wochen, ihr Gewicht 30 bis 40 g. Während der Versuche wurden die Tiere unter einheitlichen und gleichbleibenden Bedingungen bei einer durchschnittlichen Raumtemperatur von 22°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 40 bis 50 % in Makrolonkäfigen gehalten. Als Futter erhielten die Mäuse "Altromin" Mäusediät (Fa. Altrogge, Lage/Lippe) und Wasser ad libitum.

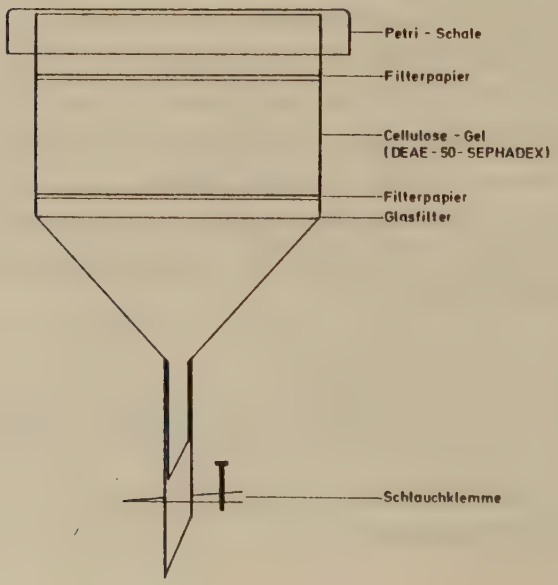
Isolierung der Trypanosomen

Um gleichbleibende reproduzierbare Versuchsergebnisse zu gewährleisten, wurden die Versuche mit isolierten, weitgehend von Blutbestandteilen befreiten Trypanosomen durchgeführt. Dabei kam die Methode nach LANHAM (1968) bzw. LANHAM und GODFREY (1972)

zur Verwendung. Männliche Mäuse wurden bei sehr hoher Parasitämie (≥ 50 Parasiten/Gesichtsfeld = GF) nach Äthernarkose durch Herzpunktion unter Zugabe von Heparin (Vetren^{R}, Fa. Promonta) in einer Dosierung von 10 I.E./ml entblutet. Das Blut wurde im Verhältnis 1 : 2 mit steriler Pufferlösung, vorwiegend BSG (Bicine buffered saline-glucose, pH 8,0) verdünnt. Abweichend von LANHAM betrug die Temperatur der Pufferlösungen 20°C.

Die Säule bestand aus einer Filternutsche mit Glasfilter (Fa. Schott, Mainz), dessen Porenweite maximal 100 bis 160 μm betrug (Porosität 1). Auf den Glasfilter wurde ein Filterpapier gelegt und darauf

Abb. 1 Säule nach LANHAM (1968)



die equilibrierte DEAE-Sephadex-A 50-Cellulose (Pharmacia, Uppsala) bis zu einer Höhe von ca. 2/3 des Säulendurchmessers geschichtet. Die Abdeckung der Celluloseoberfläche erfolgte mit einem weiteren Filterpapier. Der Durchfluß durch die Säule wurde durch einen Schlauch samt Schlauchklemme an der unteren Öffnung der Filternutsche geregelt. Das Bedecken der Säulenoberfläche mit einer umgestülpten Petrischale verhinderte Verunreinigungen des Filterpapiers auf der Celluloseschicht (Abb. 1).

Das trypanosomenhaltige, mit Puffer 1 : 2 verdünnte Blut wurde auf dem Filterpapier über der Cellulose-Gel-Schicht gleichmäßig verteilt. Durch entsprechendes Öffnen der Schlauchklemme wurde eine Tropfgeschwindigkeit von ca. 30 Tropfen pro Minute eingestellt. Sobald der Blut-Puffer-Spiegel die Geloberfläche erreichte, wurde vorsichtig Puffer zur Vermeidung des Austrocknens der Säule nachgefüllt.

Inokulum

Das aus der Säule gewonnene Eluat wurde mikroskopisch auf die Anwesenheit von Trypanosomen überprüft. Das anfänglich klare Eluat bekam allmählich milchig-trübes Aussehen und wies nach ca. 25 bis 30 Minuten mehr als 50 Parasiten pro Gesichtsfeld auf. Um die Trypanosomen dieser Fraktion weitgehend von Plasmaanteilen zu befreien, wurden sie zweimal zentrifugiert (6500 U/min = 9500 g über 5 Minuten in Roto-Silenta III, Fa. Hettich) und zweimal erneut in sterilem Puffer aufgeschwemmt. 0, 4 ml dieser Suspension wurden jeweils mit 1, 6 ml des zu prüfenden Mediums gemischt. Dabei ergab sich, daß auf eine Mediumeinheit (2 ml) annähernd 10^6 Trypanosomen kamen.

Haltung der Trypanosomen im Medium

Jeweils 2,0 ml Medium samt 0,4 ml Inokulum (meist BSG-Lösung plus Trypanosomen) wurden in Leighton-Tubes (Fa. Bellco) inkubiert. In der Mehrzahl der Fälle erfolgte die Aufbewahrung der Röhrchen im Brutschrank (Fa. Memmert) bei 25°C ± 1°C, nur wenn erwähnt, im Brutschrank bei 37°C ± 1°C oder im Kühlschrank bei 5° ± 1°C. Je ml Medium wurden 100 I.E. Penicillin und 100 γ Streptomycin zugefügt.

Untersuchung der Trypanosomen

a, Motilität und Überlebenszeit

Bei klaren Medien wurden die Lösungen in Leighton-Tubes unter dem Plankton-Mikroskop bei 100facher Vergrößerung auf Anwesenheit und Beweglichkeit der Trypanosomen untersucht. Trübe Medien wurden unter dem Mikroskop bei 400facher Vergrößerung geprüft. Als Überlebenszeit wurde der Zeitraum definiert, der vom Zeitpunkt der Übertragung auf das Medium bis zum Verschwinden des letzten motilen Parasiten reicht.

b, Infektiosität

0,2 ml parasitenhaltiges Medium wurden steril entnommen und jeweils 0,1 ml davon einer männlichen Maus intraperitonäal injiziert. Die Blutentnahme zur Kontrolle der Parasitämie erfolgte durch Kupieren der Schwanzspitze. Die Nativpräparate wurden täglich unter dem Mikroskop bei 400facher Vergrößerung auf Trypanosomen geprüft. Die Höhe der Parasitämie wurde nach folgendem Schema beurteilt:

- :			0 Parasiten	/ 50 GF
(+) :			ganz vereinzelt	
+ :			1 Parasit	/ 10 GF
2 + :			1 Parasit	/ 1 GF
3 + :		bis	5 Parasiten	/ 1 GF
4 + :		bis	50 Parasiten	/ 1 GF
5 + :	mehr	als	50 Parasiten	/ 1 GF

4 Wochen nach Infektion der Versuchstiere wurde die Untersuchung eingestellt.

c, Morphologie

Die morphologische Untersuchung der Trypanosomen aus dem Medium wurde an Giemsa (Fa. Merck, Darmstadt) gefärbten Präparaten durchgeführt.

Untersuchung der Medien

a, pH-Wert

Die Messung der pH-Werte erfolgte mit einem pH-Meter Modell 291 (Fa. Pye-Unicam), Meßelektrode Typ 405 (Fa. Ingold, Frankfurt).

b, Osmolalität

Die Messungen der Osmolalität (mOsm/kg) erfolgten mit jeweils 0,1 ml Medium in einem Halbmikro-Osmometer (Fa. Knauer, Berlin).

Zusammensetzung der Elektrolyt- und Pufferlösungen

Chemikalien für Elektrolyt- und Pufferlösungen stammten von Fa. Merck, Darmstadt und von Serva-Chemie, Heidelberg. Zellkulturmedien, Antibiotikalösungen und foetales Kälberserum wurden von Difco (Fa. Nordwald, Hamburg) und von Seromed, München bezogen.
Sämtliche Elektrolyt- und Pufferlösungen wurden vor Gebrauch frisch hergestellt und bei 120°C über 15 Minuten autoklaviert.

Pufferlösungen:

PSG-3-Pufferlösung nach GODFREY und LANHAM (1971)

Na_2HPO_4	5,39	g	NaCl	1,7	g
$NaH_2PO_4 \times H_2O$	0,31	g	Glukose	10,0	g
			Aqua dest. ad	1000	ml

BSG-Pufferlösung nach TAYLOR, LANHAM und WILLIAMS (1974)

Bicine	8,16	g	NaCl	2,92	g
Glukose	1,26	g	Saccharose	18,83	g
KCl	0,372	g	$CaCl_2$-Lsg 0,2 m	100	ml
$MgCl_2$	0,813	g	NaOH 1 m	35	ml
			Aqua dest. ad	1000	ml

Elektrolytlösungen:

Physiologische Kochsalzlsg. DAB 6:			NaCl	0,9	g
			Aqua dest. ad	100	ml

Ringerlösung (HALLMANN, 1966)

NaCl	6,0	g	$MgSo_4 \times 7H_2O$	0,1	g
$CaCl_2$	0,1	g	KH_2PO_4	3,0	g
			Aqua dest. ad	1000	ml

Ringer-Locke-Lösung (HALLMANN, 1966)

NaCl	8,0 g	$CaCl_2$		0,2 g
KCl	0,2 g	Dextrose		1,0 g
		Aqua dest.	ad	1000 ml

Locke's Lösung (LUMSDEN, 1965)

NaCl	9,0 g	NaH_2CO_3		0,2 g
KCl	0,42 g	Glukose		2,0 g
$CaCl_2$	0,24 g	Aqua dest.	ad	1000 ml

Alsever's Lösung (LUMSDEN, 1965)

NaCl	4,2 g	Na-citrat x 5 1/2 H_2O		8,0 g
Glukose	20,5 g	Acid.citric.x1 H_2O		0,55 g
		Aqua dest.	ad	1000 ml

Lösung nach Tyrode (HALLMANN, 1966)

Lsg I		Lsg II		
NaCl	8,0 g	$NaHCO_3$		1,0 g
KCl	0,2 g	Na_2HPO_4		5,0 mg
$CaCl_2$	0,2 g	Glukose		1,0 g
$MgCl_2$	0,1 g	Aqua dest.	ad	500 ml
Aqua dest. ad	500 ml			

Haemaccel^R (Behringwerke, Marburg)

Polymerisat aus abgebauter Gelatine				35,0 g
NaCl	8,5 g	$CaCl_2$		0,7 g
KCl	0,38 g	Aqua dest.	ad	1000 ml

Erythrozytenlysat

Männliche Mäuse wurden nach Äthernarkose durch Herzpunktion entblutet. Das Blut wurde 5 Minuten bei 6500 U/min = 9500 g zentrifugiert, das Plasma mit Leukozytenschicht entfernt und die Erythrozyten dreimal mit Pufferlösung gewaschen. Zur Zerstörung der Erythrozytenmembran wurden sie mindestens dreimal tiefgefroren (- 25°C) und wieder aufgetaut. Die Zerstörung der Erythrozyten wurde mikroskopisch kontrolliert.

Trypanosomenlysat

Nach der LANHAM-Methode isolierte Trypanosomen wurden auf analoge Weise behandelt.

Gewinnung von Hühnereiklar und Eidotter

Eiklar wurde nach steriler Öffnung frischer Hühnerbruteier (Bayerische LSL-Vermehrung, weiße Leghornrasse) unter sterilen Kautelen entnommen. Ebenso wurde bei der Gewinnung von sterilem Eidotter verfahren.

Haeminlösung

Die Lösung wurde nach der Methode von BRUN und JENNI (1977) hergestellt. 250 mg Haemin (Serva-Chemie, Heidelberg) wurden in 50 ml 0,05 n NaOH gelöst und die Lösung mit Aqua dest. auf 100 ml aufgefüllt wurde. Der pH-Wert wurde mit 1 n HCl auf 8,0 eingestellt. Die Lösung wurde bei 120°C über 15 Minuten autoklaviert.

Anzahl der Versuchsansätze

Alle Versuche wurden mindestens zweimal durchgeführt. Je Versuchsansatz wurden 2 Bellco-Röhrchen verwendet. Bei Versuchen über einen längeren Zeitraum wurden entsprechend mehr Röhrchen angesetzt.

B. ERGEBNISSE

1. Einfluß der physikalischen, chemischen und technischen Methodik auf Lebensdauer und Infektiosität von T. evansi

a, Isolierungsverfahren (LANHAM, 1968)

Zur Prüfung des Einflusses der Isolierungsmethode wurden einmal isolierte Trypanosomen in Vollblut einer nicht infizierten Maus gegeben, zum anderen wurde im Vergleich dazu Blut einer mit T. evansi infizierten Maus unter den gleichen Bedingungen, d. h. auch unter Zusatz von Puffer, geprüft.
Die Blutentnahme erfolgte bei infizierten Mäusen auf dem Höhepunkt der Parasitämie (5 +). Aus einem Teil des heparinisierten (10 I.E./ml) Blutes wurden die Trypanosomen nach der LANHAM-Methode isoliert, zweimal in BSG-Pufferlösung gewaschen und schließlich in diesem Puffer suspendiert. 0,4 ml der Suspension wurde zu 1,6 ml Vollblut einer nicht infizierten Maus gegeben. 1,6 ml des restlichen trypanosomenhaltigen Blutes wurden zum Vergleich mit 0,4 ml (20 %) BSG-Puffer gemischt.
Die Untersuchung auf Lebensdauer und Infektiosität erfolgte im 6stündigen Rhythmus. Der Versuch wurde bei 25°C durchgeführt.

Überlebenszeit:
Motile Trypanosomen waren, wenn auch in stetig abnehmender Zahl, in beiden Medien noch nach 24 Stunden zu finden. In der Suspension mit den nach LANHAM isolierten Parasiten bewegten sich die Trypanosomen in einer relativ größeren Anzahl als in der Vergleichslösung. Es traten aber gehäuft Aggregationen der Parasiten auf.

Infektiosität:
Bis zur 18. Stunde war in beiden Suspensionen kein Infektiositätsverlust der Trypanosomen nachweisbar. Beim Infektionsversuch nach 24 Stunden zeigte sich bei den isolierten Parasiten eine deutliche Verlängerung der Präpatenz- und Patenzzeit. Entsprechend der Abnahme der Trypanosomenzahl ergab sich auch bei den nicht isolierten Parasiten eine geringgradige Verlängerung der Präpatenzzeit.

b, Puffersysteme und pH-Wert

Zur Untersuchung des Einflusses unterschiedlicher Puffersysteme - PSG, BSG, TRIS, HEPES - wurde die Überlebenszeit von T. evansi in diesen Lösungen bei entsprechenden pH-Werten geprüft (Abb. 2).

Zur Verwendung kamen als Puffer:
PSG mit den pH-Werten von 7, 0, 7, 4 und 8, 0; BSG mit 8, 0; TRIS mit 8, 0 und HEPES mit 7, 4.
Die isolierten Trypanosomen wurden, um restliches Plasma weitgehend zu entfernen, zweimal in der gleichen Pufferlösung gewaschen, in der sie später suspendiert werden sollten. 0, 4 ml (20 %) der Pufferlösung mit suspendierten Parasiten wurden zu 1, 6 ml Puffer des gleichen pH-Wertes gegeben.
Untersucht wurden die Überlebenszeit der Trypanosomen und der pH-Wert des Mediums zu Beginn und am Ende der Überlebenszeit der Parasiten. Der Versuch fand bei 25°C statt.

PSG- und BSG-Pufferlösungen mit einem pH-Wert von 8, 0 gewährten mit 28 bzw. 24 Stunden die längsten Überlebenszeiten. In der PSG-Lösung war die Absterberate der Trypanosomen bis zur 20. Stunde gleichmäßig. In den letzten 8 Stunden waren nur noch vereinzelt Parasiten am Leben. In BSG-Lösung nahm die Trypanosomenzahl bis Versuchsende gleichmäßig ab. Nach 24 Stunden

wurden keine lebenden Parasiten mehr festgestellt. PSG-Puffer mit den pH-Werten von 7, 4 und 7, 0 ermöglichten nur wesentlich kürzere Überlebenszeiten. Bei gleichmäßiger Abnahme der Parasitenzahl waren nach 20 bzw. 12 Stunden keine motilen Trypanosomen mehr zu finden. Bei TRIS- und HEPES-Lösungen waren schon nach 6 Stunden alle Parasiten abgestorben. Der pH-Wert fiel im Laufe des Versuchs bei allen Pufferlösungen ab (Abb. 2). Die Parasiten in den PSG-Lösungen waren im Vergleich zur BSG-Lösung weniger bewegungsaktiv und aggregierten auch häufiger.

Abb. 2 Überlebenszeit von T. evansi in unterschiedlichen Puffersystemen

Puffer	Überlebenszeit (Stunden)	pH-Werte	
		A	B
PSG	12	7, 0	6, 9
PSG	20	7, 4	7, 2
PSG	28	8, 0	7, 5
BSG	24	8, 0	7, 9
TRIS	< 6	8, 0	7, 2
HEPES	< 6	7, 4	7, 2

A: Ausgangswert
B: bei Versuchsende

c, Einfluß autoklavierter und nicht autoklavierter Puffersysteme auf die Überlebenszeit und Infektiosität von T. evansi

Der Vergleich wurde im Kulturmedium M 199 unter Zusatz von 10 % Erythrozytenlysat und 25 % Hühnereiklar durchgeführt. Als Puffer kamen PSG- und BSG-Lösungen zur Verwendung; von einer Prüfung der TRIS- und HEPES-Puffer wurde wegen der kurzen Über-

lebenszeit der Parasiten in diesen Systemen abgesehen. Die Trypanosomen wurden jeweils in 0, 4 ml (20 %) der Pufferlösung suspendiert und danach auf das Medium verbracht.
Die Versuche fanden bei Kühlschrank- (5°C) und bei Zimmertemperatur (25°C) statt (Abb. 3).

Überlebenszeit:
In Medien mit autoklaviertem PSG-Puffer waren bei 5°C und 25°C von Anfang an die meisten Trypanosomen unbeweglich. Die übrigen Parasiten bewegten sich schwerfällig. In diesen Medien überlebten die Trypanosomen sowohl bei Kühlschrank- als auch bei Zimmertemperatur 3 Tage.
In den übrigen Medien traten bei 5°C ab dem 3. Tag, am ehesten im nicht autoklavierten PSG-Puffer, zunehmend Degenerationsformen auf. Von diesem Zeitpunkt an war die Zahl der morphologisch unveränderten Parasiten in stetiger Abnahme begriffen. Als Degenerationsformen traten Parasiten mit 2 und 3 Geißeln, später auch drachen- und ballonförmige Trypanosomen auf. Im weiteren Verlauf nahm die Aggregation der Trypanosomen zu, die Bewegungsaktivität reduzierte sich jedoch. Gegen Versuchsende wurden Zellfragmente, vor allem Teile des Geißelapparates, gefunden.
Bei 25°C war eine stetige Abnahme der trypomastigoten Formen zu beobachten. Degenerationsformen, insbesondere ballonierte Rundformen, traten in sehr geringer Anzahl auf. Bei dieser Temperatur zeigten sich zwischen den einzelnen Puffern, abgesehen von autoklaviertem PSG-Puffer, keine Unterschiede (Abb. 3).

Abb. 3 Einfluß sterilisierter Puffersysteme auf die Überlebenszeit von T. evansi

Temperatur (°C)	Puffer	pH-Wert[xx]	Überlebenszeit (Stunden)
5	BSG	8,0	432
	BSG[x]	8,0	432
	PSG	8,0	432
	PSG[x]	8,0	72
25	BSG	8,0	168
	BSG[x]	8,0	168
	PSG	8,0	168
	PSG[x]	8,0	72

[x]: autoklaviert

[xx]: pH-Wert des Puffers vor Versuchsbeginn

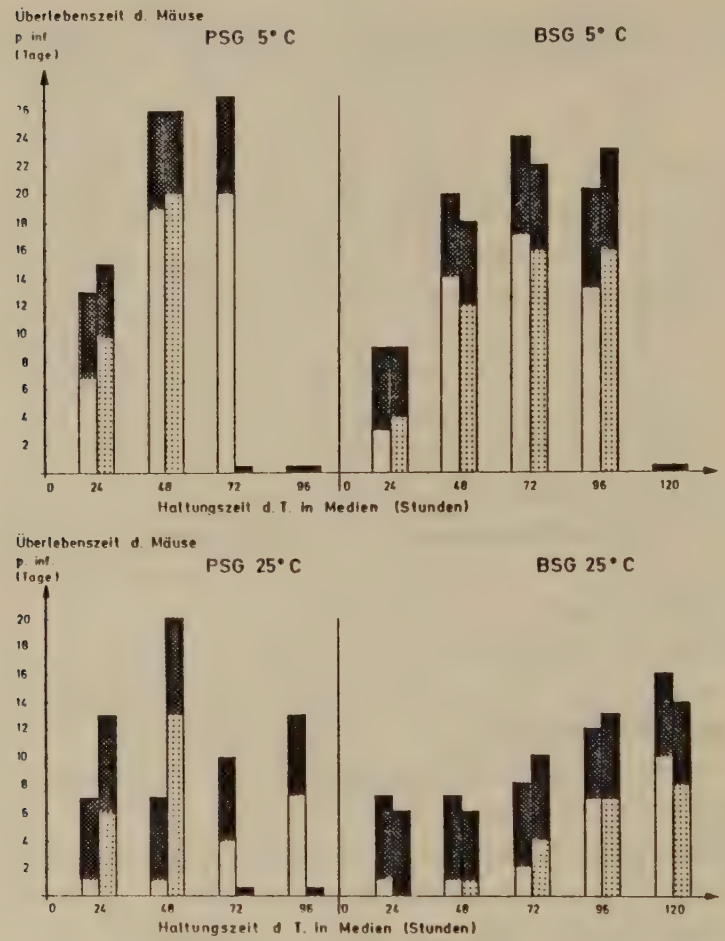
Infektiosität:

Trypanosomen, die im Medium mit autoklaviertem PSG-Puffer gehalten wurden, verloren bei 5°C und 25°C nach 2 Tagen ihre Infektiosität für Mäuse. Bei nicht autoklaviertem PSG-Puffer ging diese bei Kühlschranktemperatur nach dem 3. Tag, bei Zimmertemperatur nach dem 4. Tag verloren.

Die Sterilisation des BSG-Puffersystems hatte keinen Einfluß auf die Infektiosität der Parasiten. Diese blieb bei 5°C bis zum 4. Tag erhalten, bei 25°C konnte sie bis zum 5. Tag nachgewiesen werden.

Die Präpatenzzeiten waren bei allen Infektionsversuchen mit Trypanosomen, die in Medien bei Kühlschranktemperatur gehalten wurden, deutlich verlängert. Das gleiche war bei Parasiten zu beobachten, die bei Zimmertemperatur in Medien mit autoklavierter PSG-Lösung gehalten wurden (Abb. 4).

Abb. 4 Einfluß sterilisierter Puffersysteme auf die Infektiosität von T. evansi für Mäuse



Präpatenzzeit (autoklavierter Puffer)

Präpatenzzeit (nicht autoklavierter Puffer)

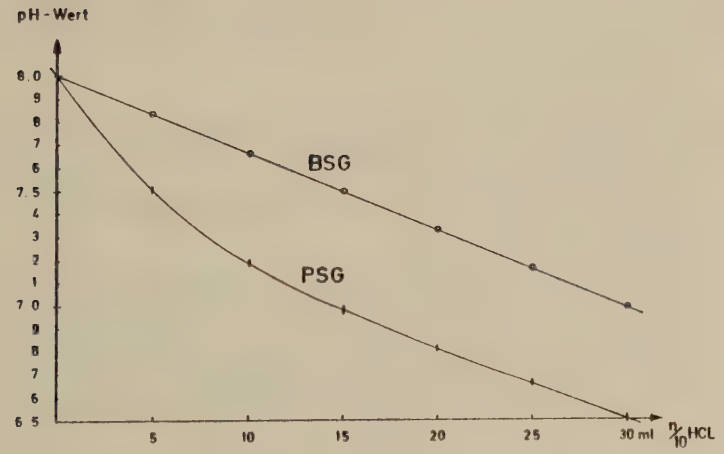
Patenzzeit

Infektiositätsverlust

d, Vergleich der Pufferkapazitäten von BSG- und PSG-Puffer

Die Frage, mit welchem Puffersystem gearbeitet werden sollte, hing entscheidend von der Kapazität des jeweiligen Puffers, d. h. vom größtmöglichen Aufnahmevermögen für Wasserstoff- und Hydroxid-Ionen bei einer möglichst geringgradigen pH-Wert-Verschiebung, ab. Da bei der Haltung von Trypanosomen durch die von den Parasiten abgegebenen Stoffwechselprodukte eine schnelle Verschiebung des pH-Wertes in den sauren, und damit für die Trypanosomen ungünstigen Bereich eintritt, sollte ein Puffersystem gefunden werden, das, selbst bei hoher Stoffwechselaktivität, den pH-Wert möglichst lange in einem für Trypanosomen günstigen Bereich stabilisiert.
Zur Prüfung der Kapazität der beiden Puffersysteme wurden jeweils 20 ml Pufferlösung mit $^{n}/_{10}$ HCl bzw. $^{n}/_{10}$ NaOH titriert (Abb. 5).

Abb. 5 Vergleich der Pufferkapazität von BSG- und PSG-Lösung



Aus der BSG-Titrationskurve geht hervor, daß der pH-Wert zwischen 8, 0 und 7, 0 fast linear, entsprechend der zugesetzten Säuremenge, abfällt. Die PSG-Kurve zeigt im Vergleich dazu einen ziemlich steilen Verlauf und flacht erst ab dem pH-Wert von 7, 4 geringgradig ab. Zur Erreichung eines pH-Wertes von 7, 0 mußte zum BSG-Puffersystem doppelt so viel Säure gegeben werden wie zum PSG-Puffer. Damit unterschied sich der BSG-Puffer im entscheidenden Bereich von 8, 0 bis 7, 0 durch die doppelte, im Bereich von 8, 0 bis 7, 4 sogar durch die dreifache Pufferkapazität vom PSG-Puffer.

Aufgrund der Tatsachen, daß der BSG-Puffer die Aktivität und Infektiosität von T. evansi am besten bewahrt, daß er über eine hohe Pufferkapazität verfügt, daß sich keine Aggregationen in ihm bilden, und er mit zweiwertigen Kationen nicht reagiert sowie zusätzlich noch biologisch inert ist (GOOD et al., 1966), wurde er in den folgenden Versuchen dem PSG-Puffer vorgezogen.

e, Penicillin-Streptomycin

Der Einfluß der in der Gewebekultur üblichen Antibiotika-Kombination aus Penicillin und Streptomycin wurde, da diese Substanzen zur Vermeidung bakterieller Kontamination zugesetzt werden sollten, in BSG-Pufferlösung bei einer Konzentration von 100 bis 1000 I.E., γ pro ml Medium geprüft.

Die isolierten und zweimal gewaschenen Trypanosomen wurden in 2, 0 ml BSG-Pufferlösung suspendiert und jeweils mit 0, 1 ml der unterschiedlichen Penicillin-Streptomycin-Konzentrationen versetzt (Abb. 6).
Zum Vergleich wurden unter denselben Bedingungen Trypanosomen in reiner BSG-Lösung gehalten. Der Einfluß des Antibiotika-Gemisches wurde nach den Kriterien "Motilität" und "Überlebenszeit" der Trypanosomen geprüft. Der Versuch wurde bei 25^{O}C durchgeführt.

Die Antibiotika hatten in der Konzentration von 100 und 200 I.E., γ pro ml Medium keinen schädigenden Einfluß auf die Trypanosomen. Bei Konzentrationen von 500 und 1000 I.E., γ pro ml reduzierte sich die Überlebenszeit auf 12 Stunden. Während bei 500 I.E., γ pro ml eine Veränderung der Motilität nicht festgestellt werden konnte, bedingten die Antibiotika in der Konzentration von 1000 I.E., γ pro ml eine deutliche Herabsetzung der Beweglichkeit.
Eine Verschiebung der pH-Werte wurde durch die Zugabe der Penicillin-Streptomycin-Kombination nicht beobachtet.

Abb. 6 Einfluß von Penicillin-Streptomycin auf T. evansi

Penicillin-Streptomycin (I.E., γ/ml Medium)	Überlebenszeit mit Antibiotika (Stunden)	Überlebenszeit ohne Antibiotika (Stunden)
100	24	24
200	24	24
500	12	24
1000	12	24

2. Einfluß unterschiedlicher Mediumzusätze auf Überlebenszeit und Infektiosität von T. evansi

a, Blut und Blutkomponenten

Diese Versuche dienten zur Klärung der Frage, ob Blutbestandteile im Medium einen günstigen Einfluß auf die Überlebenszeit der Trypanosomen ausüben. Zu diesem Zweck wurde Blut von Mäusen fraktioniert, und seine Komponenten wurden getrennt dem jeweiligen Medium zugesetzt. In einem Versuch wurde das Hämoglobin durch Haemin, seinen chemischen Grundkörper, ersetzt.
Die Medienzusätze wurden aus Vollblut nicht infizierter Mäuse gewonnen:

Vollblut:	Blut mit Heparin (10 I.E./ml)
Blutlysat:	Blut mit Aqua dest. (1 : 10)
Erythrozyten:	Die zweimal in BSG-Lösung gewaschenen Erythrozyten wurden in einer Menge zugesetzt, die einem Volumen von 2 ml Vollblut entsprach.
Erythrozytenlysat:	Durch dreimaliges Tiefgefrieren (- 25°C) lysierte Erythrozyten.
Trypanosomenlysat:	Nach LANHAM isolierte Trypanosomen wurden dreimal gewaschen und durch mehrmaliges Tiefgefrieren (- 25°C) zerstört.
Plasma:	Überstand mit Heparinzusatz
Haeminlösung:	0,1 ml Haeminlsg/2 ml Medium (0,25 mg Haemin)

Die Substratzusätze wurden dem Zellkulturmedium M 199 zugefügt. Dieses Medium wurde verwendet, weil es sich, wie später gezeigt wird, als bestes der geprüften Zellkulturmedien erwiesen hat. Die isolierten Trypanosomen wurden, in 0,4 ml (20 %) BSG-Lösung suspendiert, dem jeweiligen Medium zugegeben (Abb. 7). Die Messungen von pH-Wert und Osmolalität wurden am Ende der Überlebenszeit vorgenommen. Der Versuch fand bei 25°C statt.

Die Überlebenszeit der Trypanosomen reichte von weniger als 20 bis zu 120 Stunden. Die kürzesten Überlebenszeiten wurden beim Medium M 199 ohne Zusatz bzw. mit Zusatz von Haeminlösung oder Trypanosomenlysat beobachtet. Die Trypanosomen überlebten am längsten bei Zusatz von 10 % Erythrozytenlysat. In allen Medien mit Blutbestandteilen reduzierte sich die Zahl der Parasiten erst gegen Ende des Versuchs deutlich. Bis zu diesem Zeitpunkt war die Motilität ungestört. Degenerationsformen oder mikroskopisch erkennbare Veränderungen der Morphologie traten nicht auf. Der pH-Wert sank im Laufe des Versuchs in allen Medien geringfügig ab, blieb jedoch mit 7,0 bis 7,6 in dem für Trypanosomen günstigen Bereich. Die Osmolalitätswerte lagen, mit Ausnahme von Blutlysat, geringfügig über dem physiologischen Bereich.

Abb. 7 Einfluß verschiedener Blutbestandteile auf die Haltung von T. evansi im Zellkulturmedium M 199

Medium	Überlebenszeit (Stunden)	pH-Wert[x]	Osmolalität[x] (mOsm/kg)
M 199 ohne Substrat	26	7,6	320
M 199 + Plasma 25 %	56	7,6	320
M 199 + Plasma 50 %	56	7,5	325
M 199 + VB 25 %	64	7,0	325
M 199 + Blutlysat 25 %	64	7,5	250
M 199 + Erythrozyten	64	7,2	325
M 199 + EL 5 %	112	7,3	315
M 199 + EL 10 %	120	7,3	315
M 199 + TL 2 %	<20	7,0	315
M 199 + Haemin	<20	7,4	305

VB: Vollblut
EL: Erythrozytenlysat
TL: Trypanosomenlysat
Blutlysat: Vollblut mit Aqua dest. 1 : 10 verdünnt
[x]: bei Versuchsende

Da sich Erythrozytenlysat in Kombination mit dem Zellkulturmedium M 199 als günstigster Zusatz erwiesen hatte, wurde sein Einfluß auf die Überlebenszeit der Trypanosomen auch in BSG-Lösung allein bei verschiedenen Konzentrationen geprüft (Abb. 8).

Die Überlebenszeit verlängerte sich bei Zusatz des Erythrozytenlysats deutlich gegenüber der Haltung in reinem BSG-Puffer. Eine Verringerung der Trypanosomenzahl war erst nach 24 Stunden in größerem Umfange zu beobachten. Nach 36 bis 48 Stunden wurden motile Parasiten nur mehr vereinzelt gefunden.
pH- und Osmolalitätswerte hielten sich, wie beim vorhergehenden Versuch, im physiologischen Bereich.

Abb. 8 Einfluß von Erythrozytenlysat auf die Haltung von T. evansi in BSG-Pufferlösung

Medium	Überlebenszeit (Stunden)	pH-Wert[x]	Osmolalität[x] (mOsm/kg)
BSG ohne Substrat	24	7, 9	305
BSG + EL 2 %	36	7, 7	305
BSG + EL 5 %	48	7, 5	305
BSG + EL 10 %	48	7, 4	300

EL: Erythrozytenlysat [x]: bei Versuchsende

b, Hühnerei-Komponenten

Der Versuch sollte zeigen, ob Hühnerei-Komponenten, Hühnereiklar (EW) und Eidotter (EG), als Substrat einen begünstigenden Einfluß auf die Haltung von T. evansi aufweisen. Die Prüfung fand anfänglich nur im BSG-Puffer statt, um mögliche störende Einflüsse bei einer Vielzahl von Komponenten, wie sie in den Gewebekulturmedien vorliegen, auszuschalten.

Den in BSG-Pufferlösung suspendierten Trypanosomen wurden Eiklar und Eidotter in Konzentrationen von 10 %, 25 % und 50 % zugefügt (Abb. 9). Die Versuche wurden bei 25°C durchgeführt. Der pH-Wert von Eiklar lag bei 9,0, der von Eidotter bei 6,0.

In allen Medien mit Zusatz von Hühnereikomponenten trat eine Steigerung der Überlebenszeit gegenüber reinem BSG-Puffer ein. Abgesehen von dem Medium mit 10 % Eiklarzusatz, lebten in allen Substraten die Trypanosomen mit 48 Stunden doppelt so lange wie in der Vergleichslösung. In diesen Medien reduzierte sich die Zahl der Parasiten erst nach 22 Stunden deutlich. In den Medien mit Eiklarzusatz war die Beweglichkeit der Trypanosomen zeitweise reduziert.
In den Medien mit Dotterzusatz war die Motilität der Parasiten ungestört, häufig wurde eine Anhaftung von Dotterkügelchen beobachtet. Degenerationsformen oder andere morphologisch veränderte Trypanosomen wurden in den Medien mit Ei-Komponenten nicht gefunden.
Die unterschiedlichen pH-Werte am Ende des Versuchs waren durch die alkalische Reaktion von Eiklar bzw. durch die saure Reaktion des Eidotters bedingt. Die Osmolalitätswerte waren wieder knapp über dem physiologischen Bereich.

Zum Vergleich, ob der günstige Einfluß der Ei-Komponenten auf die Haltung von T. evansi auch im Zellkulturmedium M 199 reproduzierbar ist, fand der folgende Versuch statt (Abb. 10).

Die isolierten und in BSG-Lösung suspendierten Trypanosomen wurden dem Medium M 199 mit Eiklar bzw. Eidotter zugesetzt. Eiklar kam in 25 %iger, Eidotter in 10 und 25 %iger Konzentration zur Verwendung, da diese Konzentrationen in BSG-Pufferlösung die längsten Überlebenszeiten bei geringerer Substratmenge bewirkt hatten. Die Temperatur des Brutschranks, in dem der Versuch stattfand, betrug wiederum 25°C.

Abb. 9 Einfluß von Hühnerei-Komponenten auf die Haltung von T. evansi in BSG-Pufferlösung

Medium	Überlebenszeit (Stunden)	pH-Wert[x]	Osmolalität[x] (mOsm/kg)
BSG ohne Substrat	24	7, 9	305
BSG + EW 10 %	36	8, 1	305
BSG + EW 25 %	48	8, 3	310
BSG + EW 50 %	48	8, 5	310
BSG + EG 10 %	48	7, 6	305
BSG + EG 25 %	48	7, 2	310
BSG + EG 50 %	48	7, 0	310

EW: Hühnereiklar

EG: Eidotter

[x]: bei Versuchsende

Abb. 10 Einfluß von Hühnerei-Komponenten auf die Haltung von T. evansi im Gewebekulturmedium M 199

Medium	Überlebenszeit (Stunden)	pH-Wert[x]	Osmolalität[x] (mOsm/kg)
M 199 ohne Substrat	26	7, 6	320
M 199 + EG 10 %	96	7, 3	315
M 199 + EG 25 %	104	7, 1	315
M 199 + EW 25 %	128	7, 8	305

EG: Eidotter

EW: Eiklar

[x]: bei Versuchsende

Auch in diesem Versuch trat bei Zusatz der Hühnereikomponenten eine deutliche Steigerung der Überlebenszeit gegenüber der im reinen Medium M 199 ein. Die Trypanosomen lebten vier- bis fünfmal so lange wie in der Vergleichslösung. Der Zusatz von 25 % Eiklar zog mit 128 Stunden die längste Überlebenszeit nach sich. Eine deutliche Reduktion der Parasitenzahl war im Medium mit Eiklar ab 96 Stunden, in den Medien mit Eidotter bereits ab 72 Stunden zu beobachten. Im Medium mit Eiklarzusatz bewegten sich die Trypanosomen geringgradig langsamer, in den Medien mit Eidotter war die Beweglichkeit der Parasiten ungestört. Die Mehrzahl der Parasiten war mit Dotterkügelchen verklebt.

Die gegenüber reinem Zellkulturmedium M 199 veränderten pH-Werte am Versuchsende waren wiederum durch die alkalische Reaktion des Eiklars bzw. durch die saure Reaktion von Eidotter bedingt. Die Osmolalitätswerte lagen, wie im vorhergehenden Versuch, knapp über dem physiologischen Bereich.

c, Kombination von Erythrozytenlysat und Hühnerei-Komponenten

Da sich in den beiden vorhergehenden Versuchen der Zusatz von Erythrozytenlysat bzw. Hühnereikomponenten als günstig für die Haltung von T. evansi erwiesen hatte, versprach eine Kombination von Gewebekulturmedium M 199 mit Erythrozytenlysat und Eikomponenten eine weitere Steigerung der Überlebenszeit der Parasiten.

Die isolierten Trypanosomen wurden wiederum in 0, 4 ml (20 %) BSG-Lösung suspendiert zugefügt. Als Grundmedium kam M 199 unter Zusatz von 25 % Eiklar, Eidotter oder einem Gemisch von Eiklar und Eidotter und jeweils 10 % Erythrozytenlysat zur Verwendung. M 199 mit 10 % Erythrozytenlysat fungierte als Vergleichsmedium (Abb. 11).
Der Versuch wurde bei 25°C durchgeführt.

Überlebenszeit:

In diesem Versuch zeigte nur der Zusatz von Hühnereiklar (25 %) in Verbindung mit Erythrozytenlysat (10 %) mit 192 Stunden eine deutliche Steigerung der Überlebenszeit. Eidotter bzw. das Gemisch aus Eidotter und Eiklar ergaben in dieser Kombination mit 126 Stunden Lebenszeiten, die geringgradig über denen der Vergleichslösung lagen. Eine merkbare Reduktion der Parasitenzahl trat im Medium mit Hühnereiklar erst nach 120 Stunden ein; in den Medien mit Eidotter bzw. Eidotter und Eiklar war dies schon nach 84 Stunden der Fall.

Im Medium mit Eiklarzusatz bewegten sich die Trypanosomen etwas langsamer und schwerfälliger als in der Vergleichslösung. In den Medien mit Eidotterzusatz war ihre Motilität unbeeinflußt; die meisten Parasiten waren jedoch wieder mit Dotterkügelchen verklebt. Die pH-Werte nach Versuchsende verhielten sich wie in den vorausgegangenen Versuchen und waren durch die alkalische bzw. saure Reaktion der Zusätze bedingt. Die Osmolalitätswerte entsprachen auch denen der vorhergegangenen Versuche.

Abb. 11 Einfluß der Kombination von Erythrozytenlysat und Eikomponenten auf die Haltung von T. evansi im Kulturmedium M 199

Medium (M 199 + EL 10 %)	Überlebenszeit (Stunden)	pH-Wert[x]	Osmolalität[x] (mOsm/kg)
ohne Substrat	120	7, 3	320
+ 25 % EG	126	7, 0	305
+ 25 % EG + EW	126	7, 2	305
+ 25 % EW	192	7, 4	320

EL: Erythrozytenlysat
EG: Eidotter
EW: Eiklar

[x]: bei Versuchsende

Versuche, die Dotterkomponente aufzuschließen, zeigten keinen Erfolg. Mechanische Methoden (Homogenisator), mehrmaliges Tiefgefrieren und wieder Auftauen sowie der Zusatz von geringen Mengen Äthylalkohol, um die Dotterkügelchen zu zerstören, blieben ohne Einfluß auf die Lebensdauer.

Infektiosität:
Trypanosomen aus dem Medium M 199 mit Erythrozytenlysat und Eiklarzusatz behielten bis zum 6. Tag ihre Infektiosität für Mäuse, in den Medien mit Erythrozytenlysat und Eidotter blieben sie nur bis zum 4. Tag infektiös. Bei Trypanosomen aus allen Medien verlängerte sich die Präpatenzzeit im Versuchsverlauf von einem bis zu 12 Tagen. Die Patenzzeit blieb unverändert.

d, Foetales Kälberserum

Das zur Züchtung von vielen Gewebe- und Protozoenarten mit gutem Erfolg verwendete foetale Kälberserum sollte im folgenden Versuch auch in Verbindung mit der Haltung von T. evansi geprüft werden. Als Substrat wurde das Zellkulturmedium M 199 unter Zusatz von Erythrozytenlysat und Hühnereiklar verwendet, das sich in meinen bisherigen Versuchen am günstigsten auf die Haltung von T. evansi ausgewirkt hat.

Die nach LANHAM isolierten Trypanosomen wurden in 0, 4 ml (20 %) BSG-Pufferlösung suspendiert. Dem Kulturmedium M 199 wurden 10 % Erythrozytenlysat und 25 % Eiklar zugegeben. Die Überlebenszeit der Trypanosomen wurde bei drei unterschiedlichen Temperaturen bestimmt, bei 5°C, 25°C und 37°C (Abb. 12).

Überlebenszeit:
In den Medien, die bei gleicher Temperatur gehalten wurden, gleichgültig ob mit oder ohne foetales Kälberserum, waren die Überlebenszeiten der Parasiten gleich, und ihre zahlenmäßige Abnahme verlief

synchron. Bei 5°C wurden die trypomastigoten Blutformen von T. evansi allmählich von Degenerationsformen verdrängt. Diese morphologisch veränderten Parasiten hatten 2 bis 3 Geißeln und wurden später durch drachen- und ballonförmige Formen abgelöst. Bei letzteren traten gehäuft Aggregationen auf, und die Motilität nahm immer mehr ab. Gegen Versuchsende wurden gehäuft Zellfragmente, besonders Teile des Geißelapparates, gefunden. Die Überlebenszeit betrug für beide Medien 21 Tage.

Bei 25°C war eine ständige Reduktion der Parasitenzahl zu beobachten. In geringem Maße traten Degenerationsformen, vor allem ballonierte Rundformen, auf. Bei einer Überlebenszeit von über 7 Tagen verhielten sich beide Medien gleich.

Bei 37°C waren nach 24 Stunden nur noch wenige, nach 48 Stunden keine motilen Trypanosomen mehr zu sehen. Degenerationsformen wurden nicht gefunden.

Die pH-Werte der Medien nach Versuchsende blieben alle im physiologischen Bereich.

Abb. 12 Einfluß von foetalem Kälberserum auf die Haltung von T. evansi in M 199 mit Erythrozytenlysat und Eiklar

Temperatur (°C)	Medium	Überlebenszeit (Stunden)	pH-Wert[x]
5	M 199 + EL + EW	504	7,2
	M 199 + EL + EW + FCS	504	7,1
25	M 199 + EL + EW	180	7,1
	M 199 + EL + EW + FCS	180	7,1
37	M 199 + EL + EW	24	7,2
	M 199 + EL + EW + FCS	24	7,2

EL: Erythrozytenlysat
EW: Hühnereiklar
FCS: Foetales Kälberserum

[x]: bei Versuchsende

Infektiosität:

Trypanosomen im Medium M 199 unter Zusatz von Erythrozytenlysat und Eiklar zeigten sich mit oder ohne Zugabe von foetalem Kälberserum hinsichtlich ihrer Infektiosität für Mäuse nicht verändert. Bei 5°C waren die Parasiten 4 Tage, bei 25°C 6 Tage und bei 37°C nur einen Tag infektiös. Auch im Verlauf bzw. in der jeweiligen Länge der Präpatenz- und der Patenzzeit traten keine Unterschiede auf.

3. Lebensdauer und Infektiosität von T. evansi in verschiedenen physiologischen Elektrolytlösungen und Kulturmedien

a, Physiologische Elektrolytlösungen

Die Überlebenszeit von T. evansi wurde in insgesamt sieben verschiedenen Lösungen (Abb. 13) geprüft. Dabei ist zu berücksichtigen, daß die Trypanosomen in BSG-Lösung suspendiert waren, und somit den Elektrolytlösungen ein Puffer, u. U. sogar ein zusätzlicher, zur Verfügung stand.
Alle Lösungen wurden frisch hergestellt und anschließend 15 Minuten bei 120°C autoklaviert. Die Parasiten wurden den Lösungen in 0, 4 ml (20 %) BSG-Pufferlösung zugesetzt.

In Alsever's Lösung bewegten sich die Trypanosomen bei ständiger Abnahme ihrer Zahl nach 6 Stunden nur noch träge. In physiologischer Kochsalzlösung setzte dieser Vorgang nach 8 bis 10 Stunden, in Ringer-Locke- und BSG-Lösung nach 16 Stunden ein.
Die Überlebenszeit war mit 8 Stunden in Alsever's Lösung am kürzesten, mit 24 Stunden in BSG-Pufferlösung am höchsten.

Die pH-Werte befanden sich bei Abschluß des Versuchs, mit Ausnahme von Alsever's Lösung, im physiologischen Bereich von 7,5 bis 7,9. Bei Alsever's Lösung fand ein Umkippen in den sauren Bereich schon nach 6 Stunden statt.

Abb. 13 Überlebenszeit von T. evansi in physiologischen Elektrolytlösungen

Phys. Elektrolytlsg.	Überlebenszeit (Stunden)	pH-Wert[x]
Phys. NaCl-Lsg. DAB 6	12	7,6
Ringer-Lösung	12	7,8
Ringer-Locke-Lösung	22	7,5
Locke-Lösung	22	7,6
Alsever's Lösung	8	6,5
Tyrode-Lösung	12	7,8
BSG-Lösung	24	7,9

[x]: bei Versuchsende

Die Versuche von GOEL und SINGH (1969) wurden zur Prüfung der Überlebenszeit von T. evansi in Alsever's Lösung unter weitgehend gleichen Voraussetzungen zweimal wiederholt. Wie beschrieben, wurde 1 ml Hundeblut auf dem Höhepunkt der Parasitämie mit jeweils 1 ml Alsever's Lösung gemischt und dann im Kühlschrank bei + 5°C aufbewahrt. Für meine Versuche wurden zwei Hunde mit einem Parasitenbefall von mehr als 5×10^7 Trypanosomen/ml verwendet. Zusätzlich wurde auch Blut ähnlich stark infizierter Mäuse geprüft. Motilität und Infektiosität der Parasiten wurden täglich kontrolliert.

Im Hundeblut war die Zahl der Trypanosomen nach 3 Tagen erheblich reduziert, am 4. Tag bewegten sich nur noch vereinzelte Parasiten. Im Mäuseblut betrug die Überlebenszeit 48 Stunden.

Trypanosomen aus dem Hundeblut verloren die Infektiosität nach dem 2. Tag, Parasiten aus Mäuseblut schon nach 24 Stunden.

b, Haemaccel

Die Lebensdauer von T. evansi wurde in Haemaccel mit und ohne Zusatz von biologischen Substraten (Abb. 14) getestet.

Die Parasiten waren jeweils in 0, 4 ml (20 %) BSG-Lösung suspendiert. Folgende Zusätze wurden überprüft:
Glukose in einer Konzentration von 1, 5 %;
Erythrozyten, zweimal in BSG-Lösung gewaschen, in einer Menge, die dem Volumen von 2 ml Vollblut entsprach;
Erythrozyten- und Trypanosomenlysat in einer Konzentration von jeweils 10 %;
Plasma in unterschiedlichen Konzentrationen (5 %, 10 % und 20 %).

Der Zusatz von Erythrozytenlysat bzw. Plasma (5 %) ergab mit 24 Stunden die längste, die Zugabe von Trypanosomenlysat mit 12 Stunden die kürzeste Überlebenszeit. Bei Zugabe von Erythrozytenlysat reduzierte sich die Parasitenzahl erst ab 18 Stunden deutlich. Bei Zusatz von Trypanosomenlysat war die Anzahl motiler Trypanosomen von Beginn an stark eingeschränkt, und ein hoher Prozentsatz der Parasiten zeigte keinerlei Bewegung.
Mit den übrigen Substratzusätzen lag die Überlebenszeit bei 18 Stunden. In reinem Haemaccel traten bereits nach 4 Stunden Aggregationen der Trypanosomen auf. Die Motilität der Parasiten war gering, zahlreiche Trypanosomen waren unbeweglich.
Nach dem Zusetzen von Plasma und Trypanosomenlysat wurde eine Verschiebung des pH-Wertes in den sauren Bereich beobachtet. Bei den übrigen Zusätzen blieb der pH-Wert bis nach Versuchsende im für Trypanosomen günstigen Bereich.

Abb. 14 Überlebenszeit von T. evansi in Haemaccel und Substratzusätzen

Haemaccel	Überlebenszeit (Stunden)	pH-Wert[x]
ohne Substrat	18	7, 4
+ Glukose 1, 5 %	18	7, 4
+ Erythrozyten	18	7, 2
+ EL 10 %	24	7, 2
+ TL 10 %	12	6, 0
+ EL 10 % + TL 10 %	18	6, 5
+ Plasma 5 %	24	6, 2
+ Plasma 10 %	18	6, 1
+ Plasma 20 %	18	6, 2

EL: Erythrozytenlysat

TL: Trypanosomenlysat

[x]: bei Versuchsende

c, Vollblut

Im folgenden Versuch wurde die Überlebenszeit von T. evansi in Mäuseblut mit hohem und geringem Parasitenbefall verglichen. Dazu wurde Blut von Mäusen mit starker ($>10^7$ T.) und mit schwacher Parasitämie ($\approx 10^6$ T.) verwendet. Zusätzlich wurde die Überlebenszeit auch in einem Blutgemisch, bestehend aus dem Blut einer stark infizierten Maus ($>10^7$ T.) und einer nicht infizierten Maus, geprüft. Das Blutgemisch hatte einen Parasitenbefall von ca. 10^6 T. Schließlich wurden noch isolierte Trypanosomen im Blut einer nicht infizierten Maus aufgeschwemmt.

Die Überlebenszeit isolierter Trypanosomen im Blut einer nicht infizierten Maus war mit 18 Stunden am höchsten. Bei stetiger Ab-

nahme der Parasitenzahl war die Motilität der Parasiten nicht beeinträchtigt. Im Blutgemisch lebten die Trypanosomen 14 Stunden lang, sie bewegten sich von Beginn an schwerfällig und aggregierten sehr häufig. Die Überlebenszeit der Trypanosomen betrug im schwach parasitenhaltigen Blut 12, im stark parasitenhaltigen 8 Stunden. Im Blut mit geringem Befall war eine stetige Abnahme der Parasiten zu beobachten, gegen Versuchsende traten Aggregationen auf.

Abb. 15 Überlebenszeit von T. evansi im Blut

Medium	Überlebenszeit (Stunden)	pH-Wert[x]
Vollblut[1]	8	6, 8
Vollblut[2]	12	7, 2
Blutgemisch[3]	14	7, 2
Vollblut[4]	18	7, 1

[1]: Blut einer stark infizierten Maus ($> 10^7$ T.)

[2]: Blut einer schwach infizierten Maus ($\approx 10^6$ T.)

[3]: Blut einer stark infizierten Maus und Blut einer nicht infizierten Maus ($\approx 10^6$ T.)

[4]: Blut einer nicht infizierten Maus mit isolierten Trypanosomen ($\approx 10^6$ T.)

[x]: bei Versuchsende

Im folgenden Versuch wurde die Überlebenszeit von T. evansi in Vollblut ($> 10^7$ T.) mit Substratzusätzen bestimmt (Abb. 16).

Die Zugabe von Pufferlösungen zu Vollblut verlängerte die Lebensdauer der Trypanosomen mit 24 bzw. 28 Stunden wesentlich. Im PSG-Puffer ohne Zusätze traten nach 6 Stunden Aggregationen der Trypanosomen auf. Die längere Überlebenszeit in diesem Puffer mit 28 Stunden war auf das Überleben einiger weniger Parasiten zurückzuführen. In den beiden BSG-Puffern war die Absterberate gleichmäßiger.

Der Zusatz von Eiklar ergab eine Überlebenszeit von 33 Stunden. Die Parasiten bewegten sich jedoch schwerfällig. Nach 24 Stunden waren nur noch vereinzelt Trypanosomen zu finden.

Der Zusatz von Eiklar und Puffer steigerte die Überlebenszeit auf 48 Stunden. Die Parasitenzahl nahm nach 24 Stunden deutlich ab; nach 30 Stunden waren nur noch wenige Trypanosomen zu beobachten.

Abb. 16 Überlebenszeit von T. evansi in Vollblut mit Zusätzen

Medium	Überlebenszeit (Stunden)	pH-Wert^{x}
VB ohne Zusatz	8	6, 8
VB + BSG 20 %	24	7, 0
VB + BSG 30 %	24	7, 0
VB + PSG 30 %	28	6, 6
VB + EW 25 %	33	7, 1
VB + BSG 25 % + EW 25 %	48	7, 1
VB + PSG 25 % + EW 25 %	48	6, 6
VB + BSG 20 % + TL 10 %	12	6, 8

VB: Vollblut ($> 10^7$ T.)

EW: Hühnereiklar

TL: Trypanosomenlysat

^{x}: bei Versuchsende

Der Zusatz von Trypanosomenlysat führte zu einer starken Verkürzung der Überlebenszeit.
Die pH-Werte lagen nach Ende des Versuchs, mit Ausnahme der Medien mit PSG-Puffer bzw. Trypanosomenlysat, noch in dem für Trypanosomen günstigen Bereich.

d, Plasma

Folgende Überlebenszeiten von T. evansi ergaben sich in Medien, bestehend aus BSG-Pufferlösung und unterschiedlichen Plasmakonzentrationen (Abb. 17).
Die Trypanosomen waren, abgesehen von Plasma 100 %, in 0,4 ml (20 %) BSG-Puffer suspendiert.

Bei Plasmakonzentrationen von 25 und 50 % überlebten die Parasiten mit 54 Stunden am längsten. Nach 30 Stunden war die Motilität deutlich reduziert. Gegen Versuchsende quollen die meisten Parasiten auf, zeigten aber dennoch geringgradige Beweglichkeit. In den Medien mit 10 und 75 % Plasma betrug die Überlebenszeit 24 Stunden. Im Medium mit 75 % Plasma waren von Beginn an unbewegliche Trypanosomen vorhanden.

Abb. 17 Überlebenszeit von T. evansi in Medien mit unterschiedlichen Plasmakonzentrationen

Plasmakonz.	Überlebenszeit (Stunden)	pH-Wert[x]
10 %	24	7,9
25 %	54	7,8
50 %	54	7,8
75 %	24	7,2
100 %	8	7,0

[x]: bei Versuchsende

Die Überlebenszeit in 100 % Plasma lag bei nur 8 Stunden. Die Parasitenanzahl reduzierte sich in allen Medien dieses Versuchs kontinuierlich.
Die pH-Werte lagen, mit Ausnahme des 100 %igen Plasmas, bei Versuchsende im physiologischen Bereich.

e, Hühnereiklar

Da sich Hühnereiklar in den vorhergehenden Untersuchungen als Substratzusatz günstig auf die Überlebenszeit von T. evansi ausgewirkt hatte, sollte im folgenden Versuch geprüft werden, ob sich Eiklar auch als Grundmedium für diese Parasiten eignet.
Es kam einmal mit Vollblutzusatz und Blut einer stark parasitenhaltigen Maus ($> 10^7$ T.), zum anderen mit Zusatz von Erythrozytenlysat und BSG-Pufferlösung zur Verwendung. Die Versuche wurden bei Kühlschrank- (+ 5°C) und bei Zimmertemperatur (25°C) durchgeführt.

Überlebenszeit:
In allen Medien waren infolge des hohen Anteils von Eiklar die Trypanosomen in ihrer Motilität stark eingeschränkt. Sie bewegten sich schwerfällig, wie angeklebt. In den Medien mit Eiklar und 5 % Mäuseblut überlebten die Parasiten bei 5° und 25°C 48 Stunden.
Im Medium mit Eiklar, Erythrozytenlysat und BSG-Puffer betrug die Überlebenszeit bei Kühlschranktemperatur 10, bei Zimmertemperatur 6 Tage. Bei 5°C wurden nach 2 Tagen in großer Zahl Degenerationsformen beobachtet. Als Degenerationsform traten drachen- und ballonförmige Parasiten auf. Bei 25°C waren diese Formen in bedeutend geringerer Anzahl zu finden. In diesem Medium waren von Beginn an viele unbewegliche Trypanosomen zu sehen.

Infektiosität:
Im Medium, bestehend aus Hühnereiklar, Erythrozytenlysat und BSG-Pufferlösung, behielten die Trypanosomen bei Zimmertemperatur 4 Tage lang ihre Infektiosität für Mäuse. Während des Ver-

suchs zeigte sich eine Zunahme der Präpatenzzeit um 1 bis 5 Tage. Die Patenzzeit war mit 8 bis 10 Tagen gegenüber der Norm von 5 bis 6 Tagen verlängert.

Abb. 18 Überlebenszeit von T. evansi in Hühnereiklar mit Zusätzen

Temperatur (°C)	Medium	Überlebenszeit (Stunden)
5	EW 95 % + VB 5 %	48
	EW 70 % + EL 10 % + BSG 20 %	240
25	EW 95 % + VB 5 %	48
	EW 70 % + VB 10 % + BSG 20 %	144

EW: Hühnereiklar
EL: Erythrozytenlysat
VB: Blut einer Maus mit starker Parasitämie

f, Gewebekulturmedien

Im folgenden Versuch sollten 10 der gebräuchlichsten Gewebekulturmedien hinsichtlich ihres Einflusses auf die Haltung von T. evansi geprüft werden (Abb. 19). Die isolierten Trypanosomen wurden in 0, 4 ml (20 %) BSG-Pufferlösung suspendiert, zu 1, 6 ml (80 %) Zellkulturmedium gegeben. Die Versuche wurden bei Zimmertemperatur (25°C) durchgeführt.
Die Überlebenszeiten reichten von 12 bis 26 Stunden. Die Motilität der Parasiten in allen Medien war bis zum Versuchsende ungestört. In Yeast und M 199 war eine deutliche Verringerung der Parasitenzahl erst ab 20 Stunden feststellbar. Degenerationsformen wurden in den Medien nicht gefunden.

Die pH-Werte sowie die Osmolalitätswerte blieben im physiologischen Bereich.

Abb. 19 Haltung von T. evansi in Zellkulturmedien

Medium	Überlebenszeit (Stunden)	pH-Wert[x]	Osmolalität[x] (mOsm/kg)
Yeast[1]	26	7,5	325
M 199[1]	26	7,6	320
Eagles[1]	18	7,6	325
Eagles[2]	12	7,4	315
NCTC 109	16	7,6	325
RPMI 1640	16	7,5	295
L 15[1]	16	7,5	320
L 15[2]	12	7,2	330
MEM[1]	12	7,6	325
RAF	12	7,8	285

[1]: mit foetalem Kälberserum

[2]: mit foetalem Kälberserum und Tryptosephosphat

[x]: bei Versuchsende

Da sich Erythrozytenlysat in den früheren Untersuchungen als günstiger Zusatz erwiesen hatte, wurde im folgenden Versuch sein Einfluß in Kombination mit Zellkulturmedien geprüft (Abb. 20). Erythrozytenlysat wurde in einer Konzentration von 10 % zugefügt.

In allen Kombinationen von Gewebekulturmedien und Erythrozytenlysat erhöhte sich die Lebenszeit der Trypanosomen; eine Ausnahme bildete lediglich Rinderamnionflüssigkeit (RAF). Die Zahl

der Parasiten reduzierte sich im allgemeinen in der ersten Hälfte der Überlebenszeit; die Motilität schwächte sich erst gegen Versuchsende ab. Degenerationsformen fielen nicht auf.
Die pH- sowie die Osmolalitätswerte blieben während des Versuchs im günstigen Bereich.

Abb. 20 Haltung von T. evansi in Zellkulturmedien mit Erythrozytenlysat

Medium	Überlebenszeit (Stunden)	pH-Wert[x]	Osmolalität[x] (mOsm/kg)
M 199[1] + EL 10 %	128	7, 2	320
Eagles[1] + EL 10 %	120	7, 3	320
Eagles[2] + EL 10 %	120	7, 2	310
MEM[1] + EL 10 %	120	7, 0	325
L 15[2] + EL 10 %	120	7, 0	325
RPMI 1640 + EL 10 %	120	7, 5	295
Yeast[1] + EL 10 %	114	7, 7	310
L 15[1] + EL 10 %	102	7, 0	325
NCTC 109 + EL 10 %	96	7, 7	315
RAF	54	7, 1	270

EL: Erythrozytenlysat

[1]: mit foetalem Kälberserum

[2]: mit foetalem Kälberserum und Tryptosephosphat

[x]: bei Versuchsende

Da sich die Kombination von Erythrozytenlysat mit Hühnereiklar günstig auf die Haltung von T. evansi ausgewirkt hatte, wurden beide Substrate auch als Zusatz zu Zellkulturmedien geprüft (Abb. 21). Eiklar wurde in einer Konzentration von 25 %, Erythrozytenlysat wie bisher zu 10 % zugesetzt.

Die längsten Überlebenszeiten wurden mit 192 Stunden in der Kombination von Zellkulturmedium M 199 mit Erythrozytenlysat und Hühnereiklar erreicht. Dabei reduzierte sich nach 120 Stunden die Parasitenzahl deutlich. Die Motilität der Trypanosomen war, bei geringgradiger Abschwächung, bis Versuchsende erhalten. Degenerationsformen traten nur in sehr geringem Maße gegen Versuchsende auf. Abgesehen von der verkürzten Lebenszeit, verhielten sich die Parasiten in den übrigen Medien ähnlich.

Die pH- und Osmolalitätswerte blieben im physiologischen Bereich.

Abb. 21 Haltung von T. evansi in Zellkulturmedien mit Erythrozytenlysat und Hühnereiklar

Medium (+ EL 10 % + EW 25 %)	Überlebenszeit (Stunden)	pH-Wert[x]	Osmolalität[x] (mOsm/kg)
M 199[1]	192	7, 4	315
Yeast[1]	144	7, 5	315
Eagles[1]	144	7, 3	315
NCTC 109	144	7, 6	305
L 15[2]	136	7, 1	315
Eagles[2]	120	7, 3	320
RPMI 1640	120	7, 6	300
MEM	112	7, 3	300
L 15[1]	90	7, 0	330

EL: Erythrozytenlysat

EW: Hühnereiklar

[1] : mit foetalem Kälberserum

[2] : mit foetalem Kälberserum und Tryptosephosphat

[x] : bei Versuchsende

In der folgenden Versuchsreihe wurden verschiedene Zellkulturmedien mit M 199 kombiniert. Den Kombinationen wurde Erythrozytenlysat (10 %) und Hühnereiklar (25 %) zugesetzt (Abb. 22).

In allen Medienkombinationen überlebten die Parasiten 120 bis 144 Stunden. Nach 96 Stunden reduzierte sich die Anzahl der Trypanosomen deutlich. Die Motilität blieb ungestört erhalten.
Die pH-Werte lagen bei Versuchsende in dem für Trypanosomen günstigen Bereich.

Abb. 22 Haltung von T. evansi in Zellkulturmedien-Kombinationen mit Erythrozytenlysat und Hühnereiklar

Medienkombination (+ EL 10 % + EW 25 %)	Überlebenszeit (Stunden)	pH-Wert[x]
M 199 + MEM (1 : 1)	120	7, 3
M 199 + MEM (4 : 1)	144	7, 2
M 199 + RPMI (1 : 1)	144	7, 2
M 199 + RPMI (4 : 1)	120	7, 2
M 199 + NCTC (1 : 1)	120	7, 2
M 199 + NCTC (4 : 1)	144	7, 2

[x]: bei Versuchsende

g, Eigenes synthetisches Medium

Das im folgenden Versuch verwendete Medium weist Analogien zum SDM-77-Medium nach BRUN und JENNI (1977) auf. Die Autoren entwickelten es zur Kultivierung der Vektorenformen von T. brucei sspp. . Wie dieses Medium, bestand das von mir zusammengestellte aus einer Kombination von Zellkulturmedien, die mit essentiellen und nichtessentiellen Aminosäuren, Glukose, Haemin und anderen Zusätzen angereichert war (Abb. 23).

Überlebenszeit und Infektiosität:
Nach 24 Stunden waren im Medium keine motilen Trypanosomen mehr feststellbar. Wurde Erythrozytenlysat in einer Konzentration von 10 % zugefügt, verlängerte sich die Überlebenszeit auf 96 Stunden. Bis Versuchsende war eine stetige Abnahme der Parasitenzahl zu beobachten; die Motilität blieb ungestört.
Morphologische Veränderungen wurden nicht festgestellt.
Der pH-Wert betrug bei Versuchsende 7, 0 und war damit bis auf die untere Grenze des optimalen Bereichs abgesunken.
Die Infektiosität der Parasiten blieb bis zum 2. Tag erhalten.

Abb. 23 Zusammensetzung des verwendeten Mediums

M 199 (10 x)	100 ml
NCTC 109	500 ml
MEM Aminosäuren (100 x)	8 ml
MEM n.e. Aminosäuren (100 x)	6 ml
Na-Pyruvat (100 mM)	6 ml
Foetales Kälberserum	100 ml
Pen/Strep 100000 E/100000 γ	
L-Methionin	50 mg
L-Prolin	650 mg
L-Threonin	200 mg
Glucosamin-HCl	10 mg
Biotin	0, 1 mg
Glukose	2, 5 g
Haeminlösung	20 ml
BSG-Puffer + Trypanosomen	200 ml
Aqua dest.	ad 1000 ml

4. Einfluß unterschiedlicher Haltungsfaktoren auf Überlebenszeit und Infektiosität von T. evansi

a, Temperatur

Als Substrat für den folgenden Versuch wurde das Zellkulturmedium M 199 in Kombination mit 10 % Erythrozytenlysat und 25 % Hühnereiklar verwendet, das sich in den bisherigen Versuchen am günstigsten auf die Haltung von T. evansi ausgewirkt hatte. Die Versuche wurden bei Kühlschrank- (+ 5°C), bei Zimmertemperatur (25°C) und im Brutschrank bei 37°C durchgeführt. Neben der Überlebenszeit und der Motilität wurde täglich die Morphologie der Trypanosomen im gefärbten Präparat (Giemsa) geprüft.

Kühlschranktemperatur (+ 5°C):
Die Trypanosomen überlebten maximal 22 Tage. Die trypomastigoten Formen wurden zunehmend durch Formen verdrängt, die bei diesem Parasiten im Wirtstier nicht vorkommen. Es traten Trypanosomen mit 2 und 3 Geißeln auf. Daneben waren innerhalb der ersten 8 Tage auch drachen- und ballonförmige Parasiten zu sehen, die sich zahlenmäßig allmählich in den Vordergrund schoben. In den ersten 8 Tagen war die Motilität der Trypanosomen, auch die der morphologisch veränderten, noch weitgehend erhalten. Später traten, bei Einschränkung der Motilität, in zunehmendem Maße Aggregationen auf.
Nach 14 Tagen waren zahlreiche Auflösungsformen zu beobachten, und die absolute Zahl der Trypanosomen, insbesondere der degenerativen Rundformen, nahm deutlich ab. Die Auflösungsformen, die durch eine Abnahme der lichtbrechenden Eigenschaften gekennzeichnet waren, verringerten sich bei Versuchsende zunehmend gegenüber Zellfragmenten, besonders Teilen des Geißelapparates.

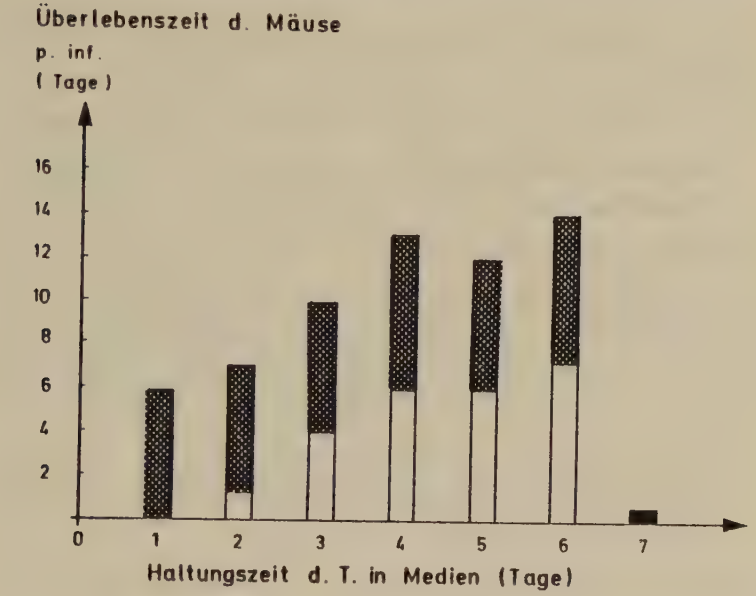
Auch der Zusatz von 5 % Glycerin zum Medium, das als membranschützende Substanz und als verwertbares Kohlenhydrat fungieren sollte, erbrachte keine Verbesserung.
Der pH-Wert blieb bei Versuchsende mit 7, 2 im günstigen Bereich.

Bei Kühlschranktemperatur blieben die Trypanosomen bis zum 4. Tag für Mäuse infektiös. Im Vergleich zur Haltung bei Zimmertemperatur war die Präpatenzzeit bis zu 18 Tagen verlängert.
Die Patenzzeit blieb dagegen unverändert.

Zimmertemperatur (25^{o}C):
Bei 25^{o}C überlebten die Trypanosomen maximal 8 Tage. Bis zum Versuchsende waren morphologisch unveränderte Parasiten anzutreffen. Im gleichen Maße blieb bis zum Ende der Untersuchungen die Motilität der Trypanosomen ungestört.
Morphologische Veränderungen traten wesentlich seltener auf als bei 5^{o}C. Dabei handelte es sich meist um ballonierte Rundformen. In weit größerem Maße waren unbewegliche, morphologisch unveränderte Trypanosomen oder Auflösungsformen zu finden. Nach 4 bis 5 Tagen reduzierte sich die Parasitenzahl deutlich.
Der pH-Wert betrug bei Versuchsende 7, 2 und lag damit noch in dem für Trypanosomen günstigen Bereich.

Bei Zimmertemperatur blieben die Parasiten 6 Tage infektiös. Während des Versuchs war eine Zunahme der Präpatenzzeit bis zu 7 Tagen feststellbar.
Die Patenzzeit blieb unverändert.

Abb. 24 Infektiosität von T. evansi bei Zimmertemperatur im Medium M 199 mit Erythrozytenlysat und Hühnereiklar



Brutschranktemperatur (37°C):

Morphologisch unveränderte Trypanosomen waren bei stetiger Abnahme der Zahl 24 Stunden zu beobachten. Am 2. Tag wurden nur noch Zellfragmente und unbewegliche Parasiten wahrgenommen. Eine Infektiosität bestand nur für 24 Stunden.

Die Motilität blieb bis Versuchsende unbeeinträchtigt erhalten.

Der pH-Wert betrug 7, 3 und lag damit im physiologischen Bereich.

b, Medienwechsel bei verschiedenen Haltungstemperaturen

Durch Medienwechsel, d. h. durch die Zufuhr bereits verbrauchter essentieller Stoffe und durch den Entzug möglicher "toxischer" Stoffwechselprodukte, sollte im folgenden versucht werden, die Überlebenszeit von T. evansi zu verlängern. Der Medienwechsel wurde bei verschiedenen Haltungstemperaturen (5°C und 25°C) und nach bestimmten Zeitabschnitten (48 und 72 Stunden) durchgeführt.

Als Substrat diente das Kulturmedium M 199 mit Erythrozytenlysat und wechselndem Zusatz von Hühnereiklar, Eidotter oder deren Gemisch. Nach Zentrifugierung des Mediums (6500 U/min = 9500 g; 5 Minuten) wurde der klare Überstand abgehoben und zur Kontrolle mikroskopisch auf Anwesenheit von Trypanosomen untersucht. Der im Röhrchen verbliebene Rest, incl. Parasiten, wurde in frisches Medium suspendiert. Mitunter setzte sich dickflüssiges Eiklar ab, von dem die Trypanosomen nicht mehr zu trennen waren.

Medienwechsel bei Kühlschranktemperatur (5°C):
Die Fragilität der Trypanosomen nahm bei Haltung im Kühlschrank schnell zu. So konnten beim zweiten Medienwechsel nach der Zentrifugierung keine motilen Parasiten mehr im Medium gefunden werden. Im Medium mit Eiklar waren nur noch Zellfragmente zu beobachten. In den Medien mit Eidotter waren, infolge der Dotterbeschaffenheit, derartige Reste nicht zu erkennen.
Die Infektiosität blieb bis zum 3. Tag erhalten. Die Präpatenzzeit war, im Gegensatz zur Patenzzeit, bedeutend verlängert.

Medienwechsel bei Zimmertemperatur (25°C):

Überlebenszeit:

Bei 25°C, ebenso bei 5°C, war der Zeitpunkt des Medienwechsels (48 oder 72 Stunden) ohne eindeutige Auswirkungen auf die Überlebenszeit. Die Trypanosomen im Medium mit Eiklarzusatz erreichten mit 12 Tagen die höchste Überlebenszeit. Parasiten in Medien mit Eidotter überlebten nur 5 bis 6 Tage. Im Medium mit Eiklar nahm nach 6 bis 7 Tagen die Trypanosomenzahl deutlich ab. In diesem Zeitabschnitt war die Motilität der Parasiten nicht verändert. Später reduzierte sie sich auffallend. In den Medien mit Dotterzusatz waren die Parasiten sehr schwer zu erkennen, obwohl ihre Motilität bis Versuchsende erhalten war.

Abb. 25 Einfluß des Medienwechsels auf die Überlebenszeit von T. evansi bei der Haltung in verschiedenen Medien

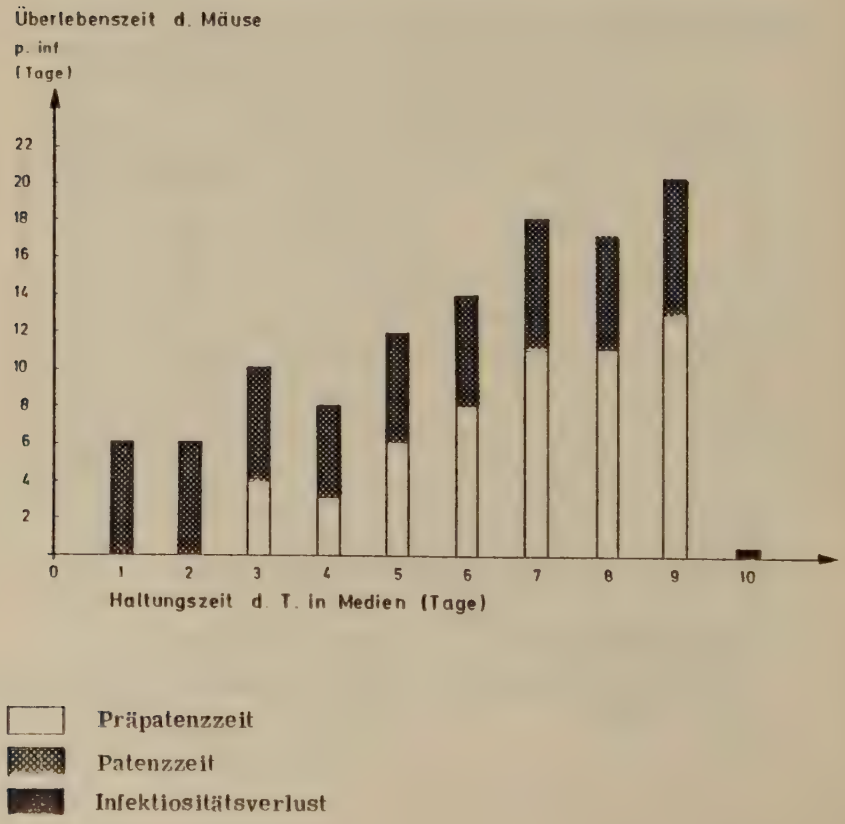
Temperatur (°C)	MW (h)	Medium M 199 + EL 10 %	Überlebenszeit (Stunden)	pH-Wert[x]
5	48	+ EW 25 %	96	7, 8
		+ EG 25 %	96	7, 2
		+ GE 25 %	96	7, 3
25	48	+ EW 25 %	288	7, 8
		+ EG 25 %	120	7, 3
		+ GE 25 %	144	7, 4
	72	+ EW 25 %	288	7, 8
		+ EG 25 %	120	7, 1
		+ GE 25 %	144	7, 4

MW: Medienwechsel
EL: Erythrozytenlysat
EG: Eidotter
EW: Hühnereiklar
GE: Gemisch aus Eiklar und -dotter
x: bei Versuchsende

In der zweiten Versuchsphase wurden häufig Verklebungen der Trypanosomen mit Dotterkügelchen festgestellt.
Die pH-Werte lagen zwischen 7,1 bis 7,8 und damit im für Trypanosomen günstigen Bereich.

Infektiosität:
Die Infektiosität blieb bei Trypanosomen aus Medien mit Eiklarzusatz bis zu 9, aus Medien mit Eidotterzusatz bis zu 4 Tagen erhalten.
Die Präpatenzzeit verlängerte sich während des Versuchs auf 13 Tage; die Patenzzeit betrug unverändert 5 bis 7 Tage.

Abb. 26 Infektiosität von T. evansi bei Zimmertemperatur im Medium M 199 mit Erythrozytenlysat und Eiklar bei Medienwechsel



IV. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Medien zu erproben, die Trypanosoma evansi, Stamm Bali, eine möglichst lange Überlebenszeit gewähren. Dabei sollte es sich um Medien handeln, die als Fertigmedien im Handel oder ohne großen Aufwand herstellbar sind.

Unter den mehr als 100 untersuchten Substraten bzw. Substrat-Kombinationen erwies sich das Kulturmedium M 199 mit 10 % Erythrozytenlysat, 25 % Hühnereiklar und 20 % BSG-Puffer als das für die Haltung des Parasiten geeignetste. T. evansi lebte bei Zimmertemperatur maximal 8, bei Medienwechsel maximal 12 Tage. Bei Kühlschranktemperatur betrug die Lebensdauer bis zu 22 Tagen. Die Infektiosität für Mäuse blieb bei Zimmertemperatur 6, bei Medienwechsel sogar 9 Tage erhalten, während sie bei Kühlschranktemperatur, trotz der sehr langen Überlebenszeit, bereits nach 4 Tagen verloren ging.

Bei einem Vergleich mit der vorliegenden Literatur zeigt sich, daß in der erwähnten Medienkombination die längste Lebensdauer von T. evansi erreicht wird. Nicht einbezogen sind dabei die Arbeiten von MATHUR (1971), bei dem sich der Parasit in dem 4N-Medium vermehrte und 26 Tage am Leben blieb. Der Autor verwendete für seine Versuche eine polymorphe T. evansi-Variante, die in ihrem physiologischen Verhalten deutliche Unterschiede zu dem von mir verwendeten Stamm aufwies und von welcher der Verfasser sogar vermutete, daß sie eine zyklische Entwicklung in der Glossina durchlaufen könne.

Mit einer Überlebenszeit von 21 Tagen kamen GOEL und SINGH (1969) in ihren Versuchen bei Kühlschranktemperatur dem eigenen Ergebnis sehr nahe. Ihr Resultat ist vor allen Dingen deshalb so

erstaunlich, weil sie ein sehr einfaches Medium - stark parasitenhaltiges Hundeblut in Elektrolytlösung (Alsever's Solution) - verwendeten. Da die Untersuchungen von KLIGLER und WEITZMAN (1925), KLIGLER, GEIGER und COMAROFF (1930), REICHENOW (1935) und BALIS (1963) bei ähnlichen Versuchen mit entsprechenden Medien wesentlich ungünstigere Resultate zeigten, wiederholte ich bei weitestgehender Übereinstimmung mit der von GOEL und SINGH (1969) angegebenen Methodik ihren Versuch nochmals, wobei auch die Spendertiere gewechselt wurden. In keinem Fall war eine längere Überlebenszeit als 4 und eine längere Infektiositätsdauer als 2 Tage zu erzielen. Eine Interpretation der unterschiedlichen Ergebnisse ist schwierig. Als mögliche Erklärung käme vielleicht in Frage, daß sich verschiedene T. evansi-Stämme bei gleichen Haltungs- und Kultivierungsbedingungen unterschiedlich anspruchsvoll zeigen. Ein weiterer Grund könnte auch darin liegen, daß sich das im Medium verwendete Hundeblut, je nach Rasse oder Immunitätslage des Spenders, verschiedenartig auf den Parasiten auswirkt.

Zur Vermeidung störender Einflüsse durch das Spenderblut bzw. seiner Bestandteile auf die Trypanosomen führte ich meine Versuche mit Parasiten durch, die durch die Isolierungstechnik nach LANHAM (1968) weitgehend von Blutbestandteilen gereinigt waren. Die Anwendung dieser Methode bedeutete gleichzeitig auch eine Standardisierung der Versuchsbedingungen hinsichtlich des jeweiligen Inokulums. Isolierungs- und Reinigungsprozeß hatten, wie ich in einem orientierenden Versuch zeigte, keinen wesentlich schädigenden Einfluß auf die Lebensdauer und die Infektiosität von T. evansi. Zum gleichen Ergebnis kamen auch TAYLOR, LANHAM und WILLIAMS (1974) bei ihren Arbeiten mit T. brucei.

Die lange Überlebenszeit der Trypanosomen, die bei Verwendung einiger Medien auftrat, liegt aller Wahrscheinlichkeit nach in der Kombination von Erythrozytenlysat und Hühnereiklar begründet. REICHENOW (1934), NICOLI (1961), DODIN und FROMENTIN (1962) und PITTAM (1970) hatten schon bei verschiedenen Trypanosomenarten nachgewiesen, daß Erythrozytenlysate - in allen Fällen durch hypotone Lösungen lysierte Erythrozyten - einen günstigen Einfluß auf Haltung und Züchtung ausübten. KRIJGSMAN (1936) und BALIS (1963) stellten dies auch für T. evansi fest. Diese Beobachtungen wurden auch in den eigenen Arbeiten bestätigt. Dabei zeigten die in meinem Versuch verwendeten, durch mehrmaliges Tiefgefrieren lysierten Erythrozyten sogar eine bessere Wirkung als die mit Aqua dest. lysierten und somit verdünnten Blutkörperchen. Bei der Kombination von M 199 mit Erythrozytenlysat ergab sich eine Lebensdauer bis zu 120 Stunden, während M 199 allein nur eine Überlebenszeit von 21 Stunden ermöglichte.

Eine Erklärung für den günstigen Einfluß von Erythrozytenlysat könnte in den Arbeiten von FROMENTIN (1972) gefunden werden. Seine Versuche deuten darauf hin, daß das Wachstum von T. gambiense an die Aktivität der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase der Erythrozyten gebunden ist. Diese Aktivität wird in das Kulturmedium übertragen, und zwar unabhängig von der jeweiligen Hämoglobinkonzentration. Bei einer Lysis der Erythrozyten, wie sie in meinen Versuchen durchgeführt wurde, dürfte dieses Enzym in größerer Menge freigesetzt werden und somit für den Glukose-Metabolismus der kultivierten Trypanosomen zur Verfügung stehen. Die Folgerungen aus den Versuchen von FROMENTIN würden auch erklären, warum bei DODIN und FROMENTIN (1962) ein 24stündiger Kontakt des Mediums mit Erythrozyten bei 37°C für eine erfolgreiche Kultivierung von T. gambiense ausreichte.

Aus der nebensächlichen Rolle, die offensichtlich die Hämoglobinkonzentration in den oben erwähnten Arbeiten spielt, läßt sich ableiten, daß der Blutfarbstoff für die Entwicklung der Parasiten in der Kultur von nur untergeordneter Bedeutung ist. In meinen Versuchen wird diese Vermutung bestätigt, da die Haltung von T. evansi bei Zusatz von Haemin, des chemischen Grundkörpers von Hämoglobin, nur über kurze Zeitabschnitte möglich war, wogegen das enzymhaltige Lysat eine signifikant verlängerte Lebensdauer bedingte.

Der positive Effekt von Hühnereiklar auf die Haltung von Trypanosomen wurde bislang in der Literatur nicht erwähnt. Nachdem sich in meinen Versuchen gezeigt hatte, daß die Kombination von Eiklar mit Nährsubstraten, insbesondere mit M 199, gute Haltungserfolge mit Überlebenszeiten bis zu 128 Stunden brachte, lag die Folgerung nahe, daß sich die Kombination von Eiklar, Erythrozytenlysat und M 199 in besonderem Maße zur Haltung von T. evansi eignen könnte. Die langen Überlebenszeiten der Parasiten in dieser Substratkombination bestätigten diese Vermutung. Wurde dagegen Eidotter oder ein Gemisch von Eiklar und Eidotter, anstelle des Eiklars, verwendet, so ergab sich eine wesentlich geringere Lebensdauer. Ob der unterschiedliche Einfluß in erster Linie auf die verschiedene chemische Zusammensetzung der beiden biologischen Substrate zurückzuführen ist, läßt sich ohne Anwendung analytisch-chemischer Methoden nur schwer sagen. Sicherlich spielen dabei auch die physikalischen Konstanten, vor allem der pH-Wert, eine nicht unbedeutende Rolle. Dieser ist beim Eidotter mit 5, 9 in einem Bereich, der weit unter den optimalen Haltungsbedingungen für T. evansi liegt. KLIGLER, GEIGER und COMAROFF (1930) und BALIS (1963) zeigten, daß der optimale pH-Wert für T. evansi ebenso wie für T. brucei (LUMSDEN et al., 1965) bei 7, 5 zu finden ist. Eine Senkung unter 7, 0 führt, wie LUMSDEN und Mitarbeiter am Beispiel von T. brucei nachwiesen, zu einer erheblichen Verminderung der Akti-

vität, Infektiosität und Anzahl der Parasiten. Nach Ansicht der Autoren ist bei der Haltung von Trypanosomen der Anfangs-pH-Wert des Mediums von entscheidender Bedeutung, weil durch den Metabolismus der Parasiten ein Absinken des pH-Wertes eintritt. Deshalb übten zum Zeitpunkt der Inokulation pH-Werte zwischen 7,5 und 8,0 sowie Puffersysteme mit hoher Pufferkapazität den günstigsten Einfluß aus. In Übereinstimmung mit den genannten Autoren konnte ich ebenfalls feststellen, daß pH-Werte in diesem Bereich die besten Ergebnisse hinsichtlich Motilität, Infektiosität und Lebensdauer hatten. Um den günstigsten pH-Bereich zwischen 7,0 und 8,0 möglichst lange zu stabilisieren, wurden verschiedene Puffersysteme geprüft. Es zeigte sich, daß der BSG-Puffer die besten Eigenschaften aufwies, wie auch schon von den Arbeiten von TAYLOR, LANHAM und WILLIAMS (1974) her bekannt war. Ursachen für die Vorzüge von BSG dürften unter anderem darin liegen, daß der Puffer zwitteronischer Natur ist,daß er mit zweiwertigen Kationen (Ca^{++}, Mg^{++}) keine Bindungen eingeht und daß er schließlich biologisch inert ist (GOOD et al., 1966). Dies sind Eigenschaften, die der PSG-Puffer nicht hat. Zusätzlich zeichnet sich der Puffer durch eine wesentlich erhöhte Kapazität gegenüber PSG aus. Es ist anzunehmen, daß durch ein solches System die bei der Haltung von T. evansi in Lösung gegangenen "toxischen" Stoffwechselprodukte am sichersten und auch über den längsten Zeitraum hinweg neutralisiert werden. Daneben waren, wie bei den Versuchen von TAYLOR, LANHAM und WILLIAMS (1974), in BSG die gehäuft bei PSG auftretenden Aggregationen der Parasiten nicht zu beobachten.

Die übrigen 9 Zellkulturmedien verhielten sich ohne Zusätze hinsichtlich der Lebensdauer von T. evansi ähnlich wie das Medium M 199 und ermöglichten nur relativ kurze Überlebenszeiten. Dies ist überraschend, da sie für eine Vielzahl von Gewebe- und Proto-

zoenarten als alleiniges Substrat voll ausreichen. Durch Zusatz von Erythrozytenlysat und Hühnereiklar konnte auch bei diesen Medien bzw. Medienkombinationen die Lebensdauer von T. evansi verlängert werden. Allerdings lagen die höchsten Überlebenszeiten meist um 2 bis 3 Tage unter denen mit M 199 und Substratzusätzen.

Auch ein selbst zusammengestelltes synthetisches Medium, das Analogien zum SDM-77-Medium nach BRUN und JENNI (1977) aufweist, ergab nur nach Zusatz von Erythrozytenlysat eine Überlebenszeit von maximal 4 Tagen und damit keine wesentliche Verbesserung.

Diese Versuche machen deutlich, daß es sich bei T. evansi um einen Parasiten handeln muß, der in seinem Nährstoffbedürfnis außerordentlich differenziert und anspruchsvoll ist.

In diesem Zusammenhang fällt auf, daß neben Erythrozytenlysat auch Hühnereiklar von wesentlicher Bedeutung für die Lebensfähigkeit von T. evansi ist. So wurde eine Überlebenszeit, die derjenigen in bekannten Kulturmedien entspricht, auch in Eiklar unter Zusatz von Erythrozytenlysat und Puffer beobachtet. In diesem Medium überlebten die Parasiten bis zu 6 Tagen, wobei von Beginn an die reduzierte Motilität der Parasiten auffiel. Sie ist wahrscheinlich durch die hohe Viskosität des Eiklars bedingt. Eine Erklärung für den günstigen Einfluß des Eiklars auf die Lebensdauer der Parasiten liegt zweifellos im pH-Wert, der sich knapp über dem optimalen Bereich befindet und im vielfältigen Substratangebot, aus dem vor allem das breite Spektrum von Aminosäuren herausragt. Ohne Zugabe von Erythrozytenlysat, d. h. allein als Basismedium, erwies sich Hühnereiklar nicht vorteilhafter als beispielsweise Plasma, Vollblut oder eines der Kulturmedien. Seine Bedeutung liegt deshalb in erster Linie darin, daß es als Zusatz zu Grundmedien eine wesentliche Verbesserung bei der Haltung von T. evansi

und möglicherweise auch bei anderen Trypanosomenarten bewirkt. Es muß überraschen, warum dieses biologische Substrat bisher bei der Haltung und Kultivierung von Trypanosomen keine Verwendung fand. Aufgrund seines weiten Spektrums an Nährsubstanzen, insbesondere durch seinen Gehalt an Aminosäuren, bietet es sich gerade für Mikroorganismen mit einem differenzierten Nährstoffbedarf in besonderem Maße an.

Bei der Haltung von T. evansi in Vollblut von Mäusen, die nur ein wenig versprechendes Ergebnis zeigte, ergab sich eine bemerkenswerte Abhängigkeit zwischen Zahl und Lebensdauer der Parasiten. So war die Überlebenszeit in stark parasitenhaltigem Blut geringer als bei schwacher Parasitämie. Schon YORKE, ADAMS und MURGATROYD (1929) hatten dies beobachtet und damit begründet, daß durch eine große Anzahl von Trypanosomen mehr Nährsubstrat metabolisiert werde als durch eine geringe Anzahl, und damit eher ungünstige Milieubedingungen geschaffen würden. Die deutlich verlängerte Überlebenszeit im Blut, das aus nichtinfizierten Mäusen stammte und in das isolierte Parasiten suspendiert wurden, bekräftigte diese Annahme. In diesem Blut dürfte ein wesentlich günstigeres Nährstoffangebot, das durch Trypanosomen noch nicht abgeschöpft ist, bestehen, was sich dann in der verlängerten Lebensdauer ausdrückt.

Meine Untersuchungen hinsichtlich der Haltung der Trypanosomen in physiologischer Elektrolytlösung müssen unter dem Aspekt betrachtet werden, daß aufgrund der angewandten Isolierungsmethodik die Parasiten stets in einem Puffer mit einem geringen Anteil von Glukose - 0,02 % - suspendiert waren. Dabei zeigte sich, daß T. evansi in den Elektrolytlösungen, die nicht mehr als 0,02 % Glukose enthielten, in keinem Fall länger als 12 Stunden überlebte. Dies entsprach auch den Beobachtungen, die YORKE, ADAMS und MURGATROYD (1929) und GEIGER, KLIGLER und COMAROFF (1930) gemacht hatten.

Letzere setzten die zur Haltung von T. evansi notwendige minimale Glukosekonzentration auf 0,1 % fest. In Übereinstimmung mit MARSHALL (1948) und BALIS (1963) folgerten sie, daß Glukose zur Haltung und Züchtung dieser Parasiten von essentieller Bedeutung ist. Das bestätigte sich auch in meinen Versuchen, denn bei Zusatz von Glukose in einer Konzentration von 0,1 % und darüber verlängerte sich die Lebensdauer auf maximal 24 Stunden. Allerdings verhielt sich die Steigerung der Überlebenszeit nicht proportional zur Glukosekonzentration im Medium. Diese Tatsache ist darauf zurückzuführen, daß in den Elektrolytlösungen die für den Lebenserhalt nötigen Nährstoffe fehlen und durch Glukose allein nicht ersetzt werden können. Meine Ergebnisse entsprechen weitgehend denen der vorliegenden Literatur, insbesondere der Arbeiten von AWAD et al. (1969) und RAETHER und SEIDENATH (1973). Die längeren Überlebenszeiten in meinen Versuchen dürften mit der regelmäßigen Zugabe von Puffer in Verbindung stehen. Die besonderen Verhältnisse, die bei Alsever's Lösung auftraten, in der trotz hoher Glukosekonzentration nur eine kurze Lebensdauer beobachtet wurde, lassen sich mit den Untersuchungen von LUMSDEN et al. (1965) und RAETHER und SEIDENATH (1973) erklären. Der niedrige Anfangs-pH-Wert führte dazu, daß in der Folge die Stoffwechselprodukte nicht genügend lange abgepuffert werden konnten, und so nach kurzer Zeit ein für den Parasiten ungünstiges saures Milieu vorherrschte. RAETHER und SEIDENATH (1973) fanden bei Arbeiten mit der gleichen Lösung eine Erklärung darin, daß die anwesenden Citrationen, die eine hohe Affinität zu Ca^{++}-Ionen besitzen, bei Entzug der Ca^{++}-Ionen eine Schädigung der Trypanosomen verursachen.

Die Haltung von T. evansi in Haemaccel^{R} muß unter ähnlichen Gesichtspunkten gesehen werden, wie sie für die Haltung in physiologischen Elektrolytlösungen gelten. Haemaccel^{R} besteht hauptsächlich aus Elektrolyten in physiologischer Konzentration und einem Polymerisat aus abgebauter Gelatine. Damit ist es den oben angeführten Lösungen weitgehend gleichzusetzen. Gegenüber diesen besitzt Haemaccel jedoch eine deutlich erhöhte Viskosität, deren Wirkung auf Trypanosomen noch ungeklärt ist (RAETHER und SEIDENATH, 1973).

Die Haltung von T. evansi war durch Penicillin- und Streptomycin-Zusatz in allen Medien hinsichtlich bakterieller Verunreinigungen komplikationslos. Allerdings mußte, wie die Versuche zeigten, darauf geachtet werden, daß die doppelte Menge der bei Gewebekulturen üblichen Konzentration -100 I.E. Penicillin, 100γ Streptomycin pro ml Medium - nicht überschritten wurde, da es andernfalls zu einer Beeinträchtigung von Motilität und Lebensdauer kam. Da BALIS (1963) Penicillin in relativ hoher Dosierung -2000 I.E./ml - ohne ungünstigen Nebeneffekt auf T. evansi verwenden konnte, scheint die toxische Wirkung bei meinen Versuchen allein auf die erhöhte Konzentration von Streptomycin zurückzuführen zu sein.

Bei Kühlschranktemperatur war die Überlebenszeit von T. evansi im Medium M 199 mit 10 % Erythrozytenlysat, 25 % Hühnereiklar und 20 % BSG-Puffer am längsten. Die Infektiosität für Mäuse blieb aber nur bis zum 4. Tag erhalten. Die trypomastigoten Blutformen wurden im Versuchsverlauf zunehmend durch Formen verdrängt, die normalerweise nicht vorkommen: drachen- und ballonförmige Trypanosomen sowie Parasiten mit 2 bis 3 Geißeln. Im gleichen Zeitraum aggregierten die Trypanosomen in größerem Umfange und ihre Motilität schwächte sich merklich ab. Bei allen Trypanosomen, speziell

bei den ballonierten Rundformen traten lichtoptisch nur noch Zellkern, Kinetoplast und Teile des Geißelapparates deutlich hervor. Auch bei Zimmertemperatur, bei der eine Haltung 8, bei Medienwechsel sogar 12 Tage lang möglich war, konnten, allerdings in wesentlich geringerem Umfange, ähnliche Formen beobachtet werden. Sie wiesen jedoch keine Ähnlichkeit mit Kultur- bzw. Vektorenformen auf, wie diese von einzelnen Autoren bei Trypanosomen mit zyklischer Entwicklung beschrieben wurden. Da auch eine allmähliche Abnahme der lichtbrechenden Eigenschaften einsetzte, die nach RAETHER und SEIDENATH (1973) einen Maßstab für die zunehmende Schädigung der Parasiten darstellt, und gegen Versuchsende fast ausnahmslos nur Zellfragmente, insbesondere Teile des Geißelapparates, gefunden wurden, ist die Folgerung berechtigt, daß es sich bei den beschriebenen Formen nicht um funktionsfähige Kultur-, sondern um progressive Degenerationsformen handelt.

Auch die Tatsache, daß bei Kühlschranktemperatur die Trypanosomen einen Medienwechsel nach 96 Stunden nicht mehr überlebten, dürfte auf Degenerationserscheinungen zurückzuführen sein. LE PAGE (1967) beschrieb Versuche, bei denen T.brucei bei 37°C schon nach 24 Stunden nicht mehr passagiert werden konnte, da der Parasit den Belastungen des Zentrifugationsvorganges nicht gewachsen war. Durch die Haltung in bestimmten Medien und in Abhängigkeit der Temperatur scheint die Oberflächenmembran der Parasiten so stark geschädigt zu werden, daß die Fragilität der Trypanosomen rasch zunimmt.

Bei Trypanosomen mit zyklischer Entwicklung ist die Infektiosität auf trypomastigote Blut- und metazyklische Vektorenformen beschränkt (BISHOP, 1967). MENDEZ und HONIGBERG (1972) stellten bei Trypanosomen der Brucei-Gruppe fest, daß die Infektiosität der Parasiten im Medium nur an die Anwesenheit von Blutformen ge-

bunden ist. Mit deren Abnahme, bei stetiger Zunahme der Vektorenformen, geht die Infektiosität verloren. Bei meinen Versuchen mit T. evansi, bei dem in Zusammenhang mit seiner azyklischen Entwicklung die Infektiosität ausschließlich an die Blutformen gebunden ist, verschwand diese zu einem Zeitpunkt, als noch motile trypomastigote Formen im Medium vorhanden waren. Dies entspricht auch den Beobachtungen, die RAETHER und SEIDENATH (1973) bei T. brucei machten. Der Infektiositätsverlust trypomastigoter Formen dürfte damit als erstes Zeichen einer substantiellen Schädigung des Parasiten zu interpretieren sein. Die Motilität muß nach RAETHER und SEIDENATH (1973) und nach den Ergebnissen der eigenen Arbeiten damit kein Kriterium für die Funktions- bzw. Infektionsfähigkeit der Parasiten darstellen. Eine stichhaltige Interpretation der Ursachen des Infektiositätsverlustes ist unmöglich, da exakte Untersuchungen speziell über dieses Phänomen fehlen.

Bei der bisher beschriebenen Vermehrung von Trypanosomen in der Kultur handelte es sich, abgesehen von LE PAGE (1971), um Trypanosomen mit zyklischer Entwicklung. Dabei ist bekannt, daß die bei diesen Arten auftretenden Vektorenformen wesentlich einfacher und und sicherer zu kultivieren sind als Blutformen (TRAGER, 1978). Die Arbeit von HIRUMI, DOYLE und HIRUMI (1977) zeigt einen Weg, auch trypomastigote Formen kontinuierlich und ohne größere Schwierigkeiten zu züchten, nämlich auf der Gewebekultur. Es ist anzunehmen, daß durch die lebenden Zellen in der Kultur Stoffe gebildet oder frei werden, die für die Blutformen und deren Vermehrung von essentieller Bedeutung sind. Es war nicht Ziel meiner Arbeit, Untersuchungen mit Gewebekulturen vorzunehmen. Dennoch wäre überlegenswert, ob sich nicht auf der Basis eines der Medien, die sich bei meinen Versuchen für die Haltung von T. evansi empfohlen haben, in Verbindung mit einer Gewebekultur weitere Erfolge und schließlich die erstrebenswerte Vermehrung, auch von Trypanosomenarten mit azyklischer Entwicklung, erreichen ließen.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Die Arbeit befaßt sich mit Untersuchungen über die Haltung von Trypanosoma evansi, Stamm Bali, in unterschiedlichen Substraten.

Das Kulturmedium M 199 unter Zusatz von 10 % Erythrozytenlysat, 25 % Hühnereiklar und 20 % BSG-Pufferlösung erweist sich mit einer Überlebenszeit bei Zimmertemperatur (25°C) von maximal 8, bei Kühlschranktemperatur (5°C) bis zu 22 Tagen als optimales Erhaltungsmedium. Durch 48stündigen Medienwechsel kann die Überlebenszeit bei Zimmertemperatur auf maximal 12 Tage gesteigert werden. Die Infektiosität bleibt bei Kühlschranktemperatur 4, bei Zimmertemperatur 6 sowie bei Medienwechsel 9 Tage erhalten.

Als Substrate zeigen sich Erythrozytenlysat und Hühnereiklar als außerordentlich günstig hinsichtlich der Haltung von T. evansi. Dabei ist Erythrozytenlysat durch Haemin nicht ersetzbar. Glukose ist für die Haltung essentiell.

Die besten Überlebenszeiten von T. evansi werden in einem pH-Bereich zwischen 7, 0 und 8, 0 beobachtet. Der BSG- (Bicine buffered saline-glucose) Puffer erweist sich wegen seines schonenden Effektes auf T. evansi und seiner hohen Kapazität den PSG-, TRIS- und HEPES-Puffern überlegen.

Die Überlebenszeit von T. evansi in 7 der wichtigsten physiologischen Elektrolytlösungen übersteigt in keinem Fall 24 Stunden.

Eine Vermehrung der Parasiten ist in keinem der geprüften Kulturmedien möglich.

SUMMARY

Studies on the maintenance of Trypanosoma evansi - strain Bali - in different media.

Culture medium M 199 combined with 10 % lysed erythrocytes, 25 % white of egg and 20 % BSG-buffer-solution proves to be the medium suited best for keeping T. evansi alive up to 8 days at a temperature of 25°C, and up to 22 days at a temperature of 5°C. The survival time at a temperature of 25°C can be extended to 12 days by changing the medium every two days. At 5°C trypanosomes keep the infectivity for 4 days; at 25°C for 6 days and in changed media for 9 days.

The addition of lysed erythrocytes and of white of egg has an extraordinarily favourable influence on the maintenance of T. evansi. Lysed erythrocytes cannot be replaced by haemin. Glucose is essential for the survival of T. evansi.

T. evansi survives best between pH 7.0 - 8.0. Due to its slight effect on T. evansi and its great capacity BSG- (Bicine buffered saline-glucose) buffer is more effective than PSG-, TRIS- and HEPES-buffers.

T. evansi survived not longer than 24 hours in 7 of the most important physiological solutions.
T. evansi cannot be cultivated in any of the media used.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

1. AMREIN, Y.A., M.KAUFMANN, R.GEIGY (1965) : On the Reaquistion of Virulence in Trypanosomes of the Brucei group. Acta trop. 22, 193 - 203

2. AWAD, F.J., A.S.MSHELBWALA, H.M. YESUFU, Y.MAGAJI, C.ZANG (1966) : Studies on the Maintenance of the Infectivity of Trypanosoma brucei in vitro. J.Vet.Sci.U.A.R. 6, 25 - 30

3. BAKER, J.R. (1966) : Studies on Trypanosoma avium IV. The development of infective metacyclic trypanosomes in cultures grown in vitro. Parasitology 56, 15 - 19

4. BALIS, J. (1963) :Recherches sur les facteurs nécessaires à la culture "in vitro" de Trypanosoma evansi. Rev.Elev.Méd. vet.Pays trop. 16, 151 - 157

5. BALIS, J. (1964 a) : Utilisation des glucides et de leurs produits de métabolisme par Trypanosoma evansi et Trypanosoma brucei. Rev. Elev.Méd. vet.Pays trop. 17, 361 - 368

6. BALIS, J. (1964 b) : Elimination de l'acide pyruvique des milieux de culture en vue de favoriser la survie de Trypanosoma evansi. Rev.Elev.Méd.vet.Pays trop. 17, 369 - 375

7. BALIS, J. (1965) : Influence de quelques corps chimiques sur la survie in vitro de Trypanosoma evansi. I - Acides aminés et quelques-uns de leurs derrives. Rev.Elev.Méd.vet.Pays trop. 18, 95 - 100

8. BISHOP, A. (1967) : Problems in the Cultivation of some Parasitic Protozoa. In: "Advances in Parasitology" 5, 93 - 120 Academic Press London/New York

9. BRUN, R. , L. JENNI (1977) : A new semi-defined medium for Trypanosoma brucei sspp.. Acta trop. 34, 21 - 33

10. BRUTSAERT, P., C.HENRARD (1936) : La Culture des Trypanosomes pathogènes.
Ann. Soc.belge Méd.trop. 16, 479 - 481

11. BRUTSAERT, P., C.HENRARD (1938) : L'Hémoculture comme moyen auxiliaire de diagnostic de la maladie du sommeil.
C.R.Séances Soc.Biol. 127, 1469 - 1472

12. CROSS, G.A.M., J.C. MANNING (1973) : Cultivation of Trypanosoma brucei sspp. in semi-defined an defined media.
Parasitology 67, 315 - 331

13. DEMARCHI, J., J.NICOLI (1960) : La multiplication des agents des Trypanosomiases humaines africaines en culture de tissus.
Ann.Inst.Pasteur 99, 120 - 130

14. DODIN, A., H.FROMENTIN (1962) : Premier essai de culture de Trypanosomes en milieu synthétique.
Bull.Soc.Path.exot. 55, 798 - 804

15. FROMENTIN, H.(1961) : Entretien de Trypanosoma gambiense sur cultures de tissu.
Bull.Soc.Path.exot. 54, 1046 - 1053

16. FROMENTIN, H. (1972) : Culture de Trypanosoma gambiense et autres Trypanosomes en milieu liquide. Influence du métabolisme glucidique des hématies servant à l'enrichissement.
Acta trop. 29, 269 - 279

17. GEIGER, A., I.J.KLIGLER, R.COMAROFF (1930) : The glycolytic power of Trypanosomes (Trypanosome evansi) in vitro.
Ann.Trop.Med.Parasit. 24, 319 - 327

18. GODFREY, D.G., S.M. LANHAM (1971) : Diagnosis of Gambian Trypanosomiasis in Man by Isolating Trypanosomes from Blood passed through DEAE-Cellulose.
Bull.Wld.Hlth.Org. 45, 13 - 19

19. GOEL, S.K., R.P. SINGH (1969) : A Preliminary Study on the Survival of Trypanosoma evansi in Alsever's Solution.
Punjab Vet. 8, 12/13

20. GOOD, N.E., G.D. WINGET, W.WINTER, T.N.CONOLLY, S. IZAWA, R.M.M.SINGH (1966) : Hydrogen Ion Buffers for Biological Research. Biochemistry 5, 466 - 477

21. HALLMANN, L. : Klinische Chemie und Mikroskopie. 10. Auflage (1966) Georg Thieme Verlag, Stuttgart

22. HAWKING, F. (1971) : The Propagation and Survival of Trypanosoma brucei in vitro at 37° C. Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg. 65, 672 - 675

23. HIRUMI, H., J.J.DOYLE, K.HIRUMI (1977) : Cultivation of bloodstream Trypanosoma brucei. Bull. Wld.Hlth.Org. 55, 405 - 409

24. HOARE, C.A. : The Trypanosomes of Mammals. 1. Auflage (1972) Blackwell Scientific Publications Oxford & Edinburgh

25. JADIN, J., D.LE RAY (1969) : Acquisitions récentes dans les techniques de culture des Trypanosomes africains. Ann.Soc.belge Méd.trop. 49, 331 - 340

26. KLIGLER, I.J., I.WEITZMAN (1925) : The mode of action of Bayer "205" on trypanosomes. Ann. Trop.Med.Parasit. 19, 235 - 241

27. KLIGLER, I.J., A.GEIGER, R.COMAROFF (1930) : Effect of the nature and composition of the substrate on the development and viability of trypanosomes. Ann. Trop.Med.Parasit. 24, 329 - 345

28. KRIJGSMAN, B.J. (1936) : Vergleichende physiologische Untersuchungen über den Stoffwechsel von Trypanosoma evansi im Zusammenhang mit der Anpassung an das Wirtstier. Z.vergl.Physiologie 23, 663 - 711

29. LANHAM, S.M. (1968) : Separation of Trypanosomes from the Blood of Infected Rats and Mice by Anion-exchangers. Nature 218, 1273/1274

30. LANHAM, S.M., D.G.GODFREY (1970) : Isolation of Salivarian Trypanosomes from Man and other Mammals using DEAE-Cellulose.
Exp. Parasit. 28, 521 - 534

31. LEHMANN, D.L. (1960) : Some culture differences between Trypanosoma rhodesiense and T.brucei in autoclaved diphasic media.
Ann.Trop.Med.Parasit. 54, 419 - 427

32. LEHMANN, D.L. (1961) : Attempts at the selective cultivation of Trypanosoma rhodesiense, T.brucei and T.congolense.
Ann.Trop.Med.Parasit. 55, 440 - 446

33. LEHMANN, D.L. (1963 a) : An autoclaved medium for the growth and possible differentiationof african trypano - somes.
Ann.Trop.Med. Parasit. 58, 6 - 8

34. LEHMANN, D.L. (1963 b) : Some physico-chemical means and a cultural method of differentiating Trypanosoma rhodesiense, T.brucei and T.congolense.
Ann. Trop.Med.Parasit. 58, 9 - 12

35. LE PAGE, R.W.F. (1967) : Short Term Cultivation of Trypanosoma brucei in Vitro at 37° C.
Nature 216, 1141/1142

36. LUMSDEN, W.H.R., M.P.CUNNINGHAM, W.A.F. WEBBER, K.VAN HOEVE, R.H.KNIGHT, V.SIMMONS (1965) : Some Effects of Hydrogen Ion Concentration on Trypanosome Numbers and Infectivity.
Exp. Parasit. 16, 8 - 17

37. MARSHALL, P.B. (1948) : The glucose metabolism of Trypanosoma evansi and the action of trypanocides.
Brit.J.Pharmacol. 3, 8 - 14

38. MATHUR, S.C. (1971) : Cultivation of a pleomorphic variant of Trypanosoma evansi and its transmission by Glossina morsitans.
Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg. 65, 427/428

39. MENDEZ, Y., B.M. HONIGBERG (1972) : Infectivity of Trypanosoma brucei-subgroup flagellates maintained in culture.
J.Parasit. 58, 1122 - 1136

40. MÜHLPFORDT, H. (1963) : Über die Bedeutung des Blepharoblasten bei parasitischen Flagellaten. Teil I
Z.Tropenmed.Parasit. 14, 357 - 398

41. NICOLI, J. (1961) : Étude préliminaire sur les conditions de culture de Trypanosoma gambiense.
Bull.Soc.Path.exot. 54, 77 - 83

42. NICOLLE, C. (1908) : Culture de Parasite du bouton d'Orient.
C.R.Acad.Sci.Paris 146, 842/843

43. NOVY, F.G., W.J. MAC NEAL (1904) : On the cultivation of Trypanosoma brucei.
J.Inf.Dis. 1, 1 - 30

44. NOVY, F.G., W.J.MACNEAL, C.B.HARE (1904) : The cultivation of the Surra trypanosome of the Philippines.
J.Amer.med.Ass. 62, 1413

45. PITTAM, M.D. (1970) : Medium for in vitro culture of Trypanosoma rhodesiense and T.brucei. Appendix to Dixon and Williamson.
Comp.Biochem.Physiol. 33, 111 - 128

46. PONSELLE, A. (1924) : Culture des Trypanosomes pathogenes.
C.R.Acad.Sci.Paris 178, 1219 - 1221

47. REATHER, W., H.SEIDENATH (1973) : Der Einfluß verschiedener physiologischer Lösungen auf die Motilität und Infektiosität von Trypanosomen (T. rhodesiense, Frischblut).
Z.Tropenmed.Parasit. 24, 285 - 295

48. RAZGHA, A. VON, (1929) : Über die Züchtung der menschenpathogenen Trypanosomen.
Z.Parasitenk. 2, 55 - 65

49. REICHENOW, E. (1934) : Die Züchtung der pathogenen Trypanosomen.
Arch. Schiff- u. Tropenhyg. 38, 292 - 302

50. REICHENOW, E. (1935) : Dauerkultur pathogener Trypanosomen.
C.R. XII^{e} Congrès International de Zoologie, Lisbonne III, Sec. X 1955 - 1968

51. TAYLOR, A.E.R., S.M. LANHAM, J.E. WILLIAMS (1974) : Influence of Methods of Preparation on the Infectivity, Agglutination, Activity and Ultrastructure of Bloodstream Trypanosomes.
Exp. Parasit. 35, 196 - 208

52. TOBIE, E.J., T.VON BRAND, B. MEHLMAN (1950) : Culture and physiological observations on Trypanosoma rhodesiense and T.gambiense.
J.Parasit. 36, 48 - 54

53. TOBIE, E.J. (1964) : Cultivation of Mammalian Trypanosomes.
J.Protozool. 11, 418 - 423

54. TRAGER, W. (1959) : Tsetse-fly tissue culture and the development of trypanosomes to the infective stage.
Ann.Trop.Med.Parasit. 53, 473 - 491

55. TRAGER, W. (1978) : Cultivation of parasites in vitro.
Am.Trop.Med.Hyg. 27, 216 - 222

56. WEINMAN, D. (1953) : African sleeping sickness trypanosomes: Cultivation and properties of the culture forms.
Ann. N.Y. Acad.Sci. 56, 995 - 1003

57. WEINMAN, D. (1960) : Cultivation of the african sleeping sickness trypanosomes from the blood and cerebrespinal fluid of patients and suspects.
Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg. 54, 180 - 190

58. YORKE, W., A.R.D. ADAMS, F. MURGATROYD (1929) : Studies in Chemotherapy: I.A. method for maintaining pathogenic trypanosomes alive in vitro at 37^{o} C for 24 hours.
Ann.Trop.Med.Parasit. 23, 501 - 518

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. H. K. Dennig für die Überlassung des Themas und seine jederzeit gerne gewährte Anleitung und Unterstützung bei der Anfertigung der Arbeit.

Herrn Professor Dr. Dr. h. c. J. Boch, dem Vorstand des Institutes, möchte ich für die Möglichkeit zur Durchführung der Arbeit danken.

LEBENSLAUF

1, Angaben zur Person :

NAME	:	Wolfgang Hans Robert H Ö G N E R
GEBURTSDATUM	:	11. Oktober 1947
GEBURTSORT	:	8070 Ingolstadt/Donau
ELTERN	:	Georg Högner, Schreinermeister Maria Clara Högner, geb. Bergler

2, Schulbildung und Studium :

1954	:	Eintritt in die Volksschule St. Moritz in Ingolstadt
1958	:	Übertritt in das Humanistische Reuchlin Gymnasium in Ingolstadt
1967	:	Zeugnis der Reife
1967 - 1969	:	Ausbildung als Apothekerpraktikant in Ingolstadt
1969	:	Pharmazeutische Vorprüfung
1969/70	:	Beginn des Studiums der Pharmazie an der Ludwig-Maximilians-Universität München
1972	:	Pharmazeutische Prüfung
1973	:	Approbation als Apotheker
1972/73	:	Beginn des Studiums der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
1977	:	Abschluss der Tierärztlichen Prüfung
1977	:	Approbation als Tierarzt
1977	:	Beginn der Dissertation am Institut für Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie